



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) **EP 0 876 482 B1**

(12) **FASCICULE DE BREVET EUROPEEN**

(45) Date de publication et mention  
de la délivrance du brevet:  
19.03.2003 Bulletin 2003/12

(21) Numéro de dépôt: 96938273.8

(22) Date de dépôt: 07.11.1996

(51) Int Cl.7: **C12N 15/12**, C07K 14/715,  
C12N 15/85, C12N 5/10,  
C12Q 1/68, C12N 15/11,  
G01N 33/53, C07K 16/28,  
G01N 33/577, G01N 33/68,  
A61K 38/17

(86) Numéro de dépôt international:  
**PCT/FR96/01756**

(87) Numéro de publication internationale:  
**WO 97/020926 (12.06.1997 Gazette 1997/25)**

(54) **POLYPEPTIDE RECEPTEUR DE L'IL-13**  
IL-13 REZEPTOR POLYPEPTID  
IL-13 RECEPTOR POLYPEPTIDE

(84) Etats contractants désignés:  
**AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC  
NL PT SE**

(30) Priorité: 06.12.1995 FR 9514424

(43) Date de publication de la demande:  
11.11.1998 Bulletin 1998/46

(73) Titulaire: **SANOFI-SYNTHELABO**  
75635 Paris Cédex 13 (FR)

(72) Inventeurs:  
• **CAPUT, Daniel**  
F-31290 Avignolet-Lauragais (FR)  
• **FERRARA, Pascual**  
F-31290 Avignolet-Lauragais (FR)  
• **LAURENT, Patrick**  
F-31190 Auterive (FR)  
• **VITA, Natalio**  
F-31450 Montgiscard (FR)

(74) Mandataire: **Bernasconi, Jean Raymond et al**  
c/o Cabinet Lavoix,  
2, Place d'Estienne d'Orves  
75441 Paris Cedex 09 (FR)

(56) Documents cités:  
• **FEBS LETTERS**, vol. 366, no. 2-3, 12 Juin 1995, AMSTERDAM, PAYS-BAS, pages 122-126, XP002010891 S. LEFORT ET AL.: "IL-13 and IL-4 share signal transduction elements as well as receptor components in TF-1 cells." cité dans la demande  
• **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, vol. 270, no. 8, 24 Février 1995, BALTIMORE, MD, TATS-UNIS, pages 3512-3517, XP002010892 N. VITA ET AL.: "Characterization and comparison of the interleukin 13 receptor with the interleukin 4 receptor on several cell types." cité dans la demande  
• **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, vol. 270, no. 15, 14 Avril 1995, BALTIMORE, MD, TATS-UNIS, pages 8797-8804, XP002010893 N. OBIRI ET AL.: "Receptor for interleukin 13." cité dans la demande  
• **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, vol. 270, no. 23, 9 Juin 1995, BALTIMORE, MD, TATS-UNIS, pages 13869-13878, XP002010894 S. ZURAWSKI ET AL.: "The primary binding subunit of the human interleukin-4 receptor is also a component of the interleukin-13 receptor."  
• **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, vol. 271, no. 46, 15 Novembre 1996, BALTIMORE, MD, TATS-UNIS, pages 29265-29270, XP002025818 M. JAVAD AMAN ET AL.: "cDNA cloning and characterization of the human interleukin 13 receptor alpha chain."

Il est rappelé que: Dans un délai de neuf mois à compter de la date de publication de la mention de la délivrance du brevet européen, toute personne peut faire opposition au brevet européen délivré, auprès de l'Office européen des brevets. L'opposition doit être formée par écrit et motivée. Elle n'est réputée formée qu'après paiement de la taxe d'opposition. (Art. 99(1) Convention sur le brevet européen).

EP 0 876 482 B1

- THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 28, 12 Juillet 1996, BALTIMORE, MD, TATS-UNIS, pages 16921-16926, XP002025819 D. CAPUT ET AL.: "Cloning and characterization of a specific interleukin (IL)-13 binding protein structurally related to the IL-5 receptor alpha chain."
- IMMUNOLOGY TODAY, vol. 17, no. 3, Mars 1996, AMSTERDAM, PAYS-BAS, pages 108-110, XP002010895 R. CALLARD ET AL.: "IL-4 and IL-13 receptors: are they one and the same?"

## Description

**[0001]** La présente invention concerne des polypeptides purifiés ayant une activité de récepteur spécifique de l'interleukine 13 (IL-13), leurs fragments biologiquement actifs et les séquences d'acides nucléiques correspondantes, et leurs applications.

**[0002]** L'IL-13 est une cytokine de 112 acides aminés récemment identifiée (1,2), sécrétée par des lymphocytes T activés, les lymphocytes B et les mastocytes après activation.

**[0003]** De par ses nombreuses propriétés biologiques communes avec l'IL-4, l'IL-13 a été décrite comme étant une cytokine "IL-4-like". Ses activités sont en effet similaires à celles de l'IL-4 sur les cellules B (3-5), les monocytes (6-10) et autres cellules non hématopoïétiques (11-12). En revanche, contrairement à l'IL-4, elle n'exercerait pas d'effet particulier sur des cellules T au repos ou activées (13).

**[0004]** Les différentes activités biologiques de l'IL-13 sur les monocytes/macrophages, les lymphocytes B et certains précurseurs hématopoïétiques ont été décrites en détail par A.J. Minty, ainsi que dans des articles de revues sur l'IL-13 (voir par ex. 14). Plusieurs données indiquent en outre que cette cytokine a un effet pleiotrope sur d'autres types cellulaires. Ces cellules non-hématopoïétiques affectées directement par l'IL-13 sont des cellules endothéliales et microgliales, des kératinocytes, et des carcinomes de rein et de colon.

**[0005]** Les activités anti-inflammatoires et immunorégulatrices de l'IL-13 peuvent être utiles par exemple dans le traitement des pathologies auto-immunes, tumorales et virales.

**[0006]** Une mise à profit de ces propriétés biologiques au plan clinique nécessite toutefois une parfaite connaissance des signaux et mécanismes par lesquels ces effets sont exercés, de façon à pouvoir les contrôler et les moduler dans les pathologies concernées.

**[0007]** L'une des étapes dans l'analyse du signal transmis par une molécule biologique au sein d'une cellule, consiste à identifier son récepteur membranaire. Les travaux réalisés à cet effet sur le récepteur de l'IL-13 ont montré que l'IL-13 et l'IL-4 avaient en commun un récepteur, ou tout au moins certains des composants d'un complexe récepteur, ainsi que des éléments de transduction de signaux (15-18). Ce récepteur est présent à la surface de différents types cellulaires, en nombre variable selon le type cellulaire considéré. La distribution comparative des récepteurs de l'IL-13 et de l'IL-4 a été indiquée par A.J. Minty (14).

**[0008]** Kondo et al. (19) ont décrit la structure d'un récepteur de haute affinité pour l'IL-4. Celui-ci est un dimère, formé par l'association d'une glycoprotéine de 140 kDa (IL-4R) et de la chaîne  $\gamma$  du récepteur de l'IL-2 ( $\gamma_c$ ). L'IL-4 peut se lier à la sous-unité glycoprotéique de 140 kDa (IL-4R ou gp 140) avec une bonne affinité ( $K_d$  comprise entre 50 et 100 pM) (15). Cependant, cette affinité est augmentée d'un facteur 2 à 3, lorsque la chaîne  $\gamma_c$  est associée à la gp 140. Cette association est en outre nécessaire à la transmission de certains signaux médiés par l'IL-4 (19,20).

**[0009]** Des expériences de compétition croisée pour la liaison, soit de l'IL-13, soit de l'IL-4, ont démontré que l'IL-4 peut normalement empêcher la liaison de l'IL-13, alors que l'IL-13 ne peut généralement empêcher que partiellement la liaison de l'IL-4 à son récepteur (17,21), et ne se fixe sur aucune des deux sous-unités du récepteur de l'IL-4, ni sur le complexe formé par leur association. Sur la base de ces observations, les auteurs de la présente invention ont supposé que le récepteur spécifique de l'IL-13 était constitué du complexe récepteur IL-4 associé avec un autre composant liant l'IL-13, (IL-13R $\beta$ ).

**[0010]** Des travaux réalisés sur une lignée cellulaire érythroleucémique capable de proliférer en réponse à l'IL-13 et à l'IL-4 (lignée TF-1), leur ont permis de montrer que ces deux cytokines produisaient des événements intracellulaires similaires après fixation sur leur récepteur (18). En parallèle, des expériences de pontage ("cross-link") leur ont permis de montrer que la gp 140 pouvait former des hétérodimères soit avec la chaîne  $\gamma$ , soit avec une nouvelle sous-unité, d'un poids moléculaire de 55 à 70 kDa (17,21).

**[0011]** D'autre part des travaux réalisés récemment sur une lignée de cellules souches embryonnaires de souris ont permis d'isoler l'ADN génomique et l'ADNc encodant pour un polypeptide de 424 résidus d'acides aminés (IL-13R $\alpha$ ), suggérant que le récepteur de l'IL-13 partageait avec le récepteur de l'IL-4 une chaîne commune pour constituer un récepteur à haute affinité (22,23), c'est-à-dire présente une affinité dont la constante  $K_d$  est située entre des valeurs comprises entre 10 pM et 100 pM environ (un récepteur de basse affinité présentant une constante  $K_d$  située entre des valeurs comprises entre 2nM et 10 nM).

**[0012]** Compte tenu de l'importance au plan médical de la compréhension fine des phénomènes de régulation de l'IL-4 et de l'IL-13, et en particulier de la possibilité de pouvoir séparer et contrôler isolément les effets produits par l'une ou l'autre de ces deux cytokines, les auteurs de la présente invention se sont intéressés, d'une part, à la caractérisation d'un polypeptide liant spécifiquement l'IL-13 avec une haute affinité et, d'autre part, à la caractérisation d'un autre polypeptide qui, seul, lie spécifiquement l'IL-13 avec une basse affinité et qui, s'il est associé avec le récepteur de l'IL-4, constitue un récepteur de haute affinité pour l'IL-13.

**[0013]** Ceux-ci ont à présent identifié une lignée cellulaire de carcinome humain exprimant le récepteur spécifique de l'IL-13 en quantité plus importante que d'autres lignées de carcinome rénal humaines connues (21), et ont réalisé le clonage de la sous-unité primaire responsable de la fixation de l'IL-13 sur le récepteur de l'IL-4/IL-13, dénommée

IL-13 R $\beta$ , ainsi que le clonage de la chaîne commune que partage le récepteur de l'IL-13 et le récepteur de l'IL-4 pour constituer un récepteur de haute affinité permettant une compétition croisée des 2 cytokines, dénommée IL-13R $\alpha$ .

[0014] La présente invention concerne donc des polypeptides purifiés liant spécifiquement l'IL-13.

5 [0015] Plus particulièrement, l'invention a pour objet des polypeptides purifiés dont les séquences d'acides aminés correspondent à celle d'un récepteur spécifique de l'IL-13 (IL-13R $\beta$  et IL-13R $\alpha$ ), ou des fragments biologiquement actifs de ceux-ci.

[0016] L'invention a également pour objet des séquences d'ADN isolées codant pour lesdits polypeptides ou leurs fragments biologiquement actifs.

10 [0017] Elle vise en outre les vecteurs d'expression contenant au moins l'une des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, et les cellules hôtes transfectées par ces vecteurs d'expression dans des conditions permettant la réplication et/ou l'expression de l'une desdites séquences nucléotidiques.

[0018] Les méthodes de production de l'IL-13R $\beta$  et de l'IL-13R $\alpha$  recombinants ou de leurs fragments biologiquement actifs par les cellules hôtes transfectées font également partie de l'invention.

15 [0019] L'invention comprend également des compositions pharmaceutiques comprenant l'IL-13R $\beta$  ou/et l'IL-13R $\alpha$  ou des fragments biologiquement actifs de ceux-ci pour la régulation des mécanismes immunologiques et inflammatoires produits par l'IL-13. Elle vise en outre une méthode pour l'identification d'agents capables de moduler l'activité de l'IL-13R $\beta$  ou/et de l'IL-13R $\alpha$ , et l'utilisation de l'IL-13R $\beta$  ou/et de l'IL-13R $\alpha$  ou de fragments de ceux-ci pour le criblage de ces agents ainsi que pour la fabrication de nouveaux produits capables de moduler l'activité du récepteur de l'IL-13.

20 [0020] L'invention comprend également des anticorps ou des dérivés d'anticorps spécifiques de l'IL-13R $\beta$  ou/et de l'IL-13R $\alpha$ .

[0021] Elle vise enfin une méthode de traitement thérapeutique pour moduler les réactions immunologiques médiées par l'IL-13, comprenant l'administration à un patient de l'IL-13R $\beta$  ou/et de l'IL-13R $\alpha$  ou d'un de leurs fragments biologiquement actif ou d'un composé capable de moduler spécifiquement l'activité de ce récepteur, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

25 [0022] Dans la description de l'invention ci-après, on utilise les définitions suivantes :

- polypeptide liant spécifiquement l'IL-13 avec une haute affinité (IL-13R $\beta$ ) : un polypeptide comprenant la séquence d'acides aminés SEQ ID n° 2 ou tout fragment ou dérivé de celui-ci biologiquement actif;
- 30 - polypeptide qui, seul, lie spécifiquement l'IL-13 avec une basse affinité et qui, s'il est associé avec le récepteur de l'IL-4, constitue un récepteur de haute affinité (IL-13R $\alpha$ ) : un polypeptide comprenant la séquence d'acides aminés SEQ ID N° 4 ou tout fragment ou dérivé de celui-ci biologiquement actif;
- biologiquement actif : capable de se lier spécifiquement à l'IL-13 et/ou de participer à la transduction du signal spécifiquement produit par l'IL-13 au niveau de la membrane cellulaire, et/ou capable d'interagir avec le récepteur spécifique de l'IL-4 (IL-4R/gp 140) pour former un complexe capable de lier l'IL-4 et l'IL-13, et/ou qui est reconnu 35 par des anticorps spécifiques du polypeptide de séquence SEQ ID n° 2 ou/et de séquence SEQ ID n°4, et/ou capable d'induire des anticorps qui reconnaissent le polypeptide de séquence SEQ ID n° 2 ou/et de séquence SEQ ID n°4;
- dérivé : tout polypeptide variant du polypeptide de séquence SEQ ID n° 2 ou/et de séquence SEQ ID n°4, ou toute molécule résultant d'une modification de nature génétique et/ou chimique de la séquence SEQ ID n° 2 ou de 40 séquence SEQ ID n°4, c'est-à-dire obtenue par mutation, délétion, addition, substitution et/ou modification chimique d'un seul ou d'un nombre limité d'acides aminés, ainsi que toute séquence isoforme, c'est-à-dire une séquence identique à la séquence SEQ ID n° 2 ou à la séquence SEQ ID n°4, à l'un de leurs fragments ou à l'une de leurs séquences modifiées, contenant un ou plusieurs acides aminés sous la forme d'énantiomère D, lesdites séquences variantes, modifiées ou isoformes ayant conservé au moins l'une des propriétés les rendant biologiquement acti- 45 ves.

[0023] La présente invention a pour objet un polypeptide purifié, comprenant une séquence d'acides aminés choisie parmi :

- 50 a) la séquence SEQ ID n° 2 ou la séquence SEQ ID n°4,  
b) toute séquence biologiquement active dérivée de SEQ ID n° 2 ou de SEQ ID n°4, selon la définition donnée précédemment.

55 [0024] La fabrication de dérivés peut avoir différents objectifs, dont en particulier celui d'augmenter l'affinité du récepteur pour l'IL-13, celui de moduler la compétition croisée entre l'IL-13 et l'IL-4, celui d'améliorer leurs taux de production, d'augmenter leur résistance à des protéases, de modifier leur activité biologique ou de leur conférer de nouvelles propriétés pharmaceutiques et/ou biologiques.

[0025] Parmi des variants biologiquement actifs des polypeptides tels que définis précédemment, on préfère les

fragments produits par épissage alternatif des transcripts (ARN messagers) du gène codant pour l'une des séquences d'acides aminés décrites ci-dessus.

**[0026]** Dans une variante avantageuse, les 8 acides aminés C-terminaux du polypeptide de séquence SEQ ID n° 2 sont substitués par les 6 acides aminés suivants : VRCVTL.

**[0027]** Selon un autre aspect avantageux, l'invention vise une forme soluble de l'IL-13R $\beta$ , dénommée IL-13R $\beta$ s, comprenant notamment le domaine extra-cellulaire du polypeptide de séquence SEQ ID n° 2 s'étendant jusqu'au résidu 343 et préférentiellement jusqu'au résidu 337 ainsi qu'une forme soluble de l'IL-13R $\alpha$ , dénommée IL-13R $\alpha$ s, comprenant notamment le domaine extracellulaire du polypeptide de séquence ID n° 4 s'étendant jusqu'au résidu 343 et préférentiellement jusqu'aux résidus compris entre 336 et 342.

**[0028]** Le polypeptide qui comprend la séquence SEQ ID n° 2 ou la séquence SEQ ID n° 4 représente un mode de réalisation particulier de l'invention. Comme cela apparaîtra dans les exemples, ce polypeptide peut être exprimé à la surface de cellules humaines pour former un récepteur de l'IL-13 fonctionnel ou s'associer avec le récepteur de l'IL-4 pour former, avec la chaîne  $\gamma$  du récepteur de l'IL-2 le complexe récepteur commun à l'IL-4 et l'IL-13.

**[0029]** La présente invention a également pour objet une séquence d'acides nucléiques isolée, choisie parmi:

- a) la séquence SEQ ID n° 1,
- b) la séquence SEQ ID n° 3,
- c) les séquences d'acides nucléiques capables de s'hybrider à la séquence SEQ ID n° 1 ou à la séquence SEQ ID n° 3, ou à leurs séquences complémentaires et codant pour des polypeptides ayant une activité de récepteur de l'IL-13, ou permettant de reconstituer un récepteur de haute affinité pour l'IL-13 et l'IL-4,
- d) les séquences d'acides nucléiques dérivées des séquences a) et b) et c) du fait de la dégénérescence du code génétique.

**[0030]** Plus particulièrement, l'invention a pour objet une séquence codant pour la partie soluble de l'IL-13R $\beta$  ou de l'IL-13R $\alpha$  et tout variant produit par épissage alternatif des transcripts de l'IL-13R $\beta$  ou de l'IL-13R $\alpha$ , conservant au moins une des propriétés biologiques décrites.

**[0031]** Un mode de réalisation préféré est représenté par une séquence d'acides nucléiques comprenant ou constituée par l'enchaînement de nucléotides s'étendant du nucléotide n° 1 jusqu'au nucléotide 1081, et préférentiellement jusqu'au nucléotide 1063 sur la séquence SEQ ID n° 1.

**[0032]** Un autre mode de réalisation préféré est représenté par une séquence d'acides nucléiques comprenant ou constitué par l'enchaînement de nucléotides s'étendant du nucléotide n° 1 jusqu'au nucléotide n° 1059, et préférentiellement jusqu'aux nucléotides compris entre les numéros 1041 et 1056 sur la séquence SEQ ID n° 3.

**[0033]** Avantageusement, la séquence d'acides nucléiques selon l'invention est une séquence codant pour une protéine correspondant à la forme mature de l'IL-13R $\beta$  ou de l'IL-13R $\alpha$ , cette protéine mature étant le résultat de la libération du peptide signal.

**[0034]** Les différentes séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être d'origine artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences d'ADN ou d'ARN, obtenues par criblage de banques de séquences au moyen de sondes élaborées sur la base de la séquence SEQ ID n° 1 ou de la séquence SEQ ID n° 3. De telles banques peuvent être préparées par des techniques classiques de biologie moléculaire, connues de l'homme de l'art.

**[0035]** Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent également être préparées par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage des banques.

**[0036]** Ces séquences nucléotidiques permettent la réalisation de sondes nucléotidiques, codant pour un polypeptide selon l'invention ou un fragment biologiquement actif de celui-ci. Les conditions d'hybridation appropriées correspondent aux conditions de température et de force ionique usuellement utilisées par l'homme du métier, de préférence à des conditions de température comprises entre ( $T_m$  moins 5°C) et ( $T_m$  moins 30°C) et de préférence encore, à des conditions de température comprises entre ( $T_m$  moins 5°C) et ( $T_m$  moins 10°C) (forte stringence),  $T_m$  étant la température de fusion, définie comme étant la température à laquelle 50 % des brins appariés se séparent. De telles sondes font également partie de l'invention. Elles peuvent être utilisées comme outil de diagnostic *IN VITRO* pour la détection, par des expériences d'hybridation, de transcripts spécifiques des polypeptides de l'invention dans des échantillons biologiques ou pour la mise en évidence de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques résultant d'un polymorphisme, de mutations ou d'un mauvais épissage.

**[0037]** Les sondes de l'invention comportent au minimum 10 nucléotides, et au maximum comportent la totalité de la séquence nucléotidique SEQ ID n° 1 ou de SEQ ID n° 3 ou de leur brin complémentaire.

**[0038]** Parmi les sondes les plus courtes, c'est-à-dire d'environ 10 à 15 nucléotides, les conditions d'hybridation appropriées correspondent aux conditions de température et de force ionique usuellement utilisées par l'homme du métier.

**[0039]** Préférentiellement, les sondes de l'invention sont marquées, préalablement à leur utilisation. Pour cela, plu-

sieurs techniques sont à la portée de l'homme du métier comme par exemple le marquage fluorescent, radioactif, chimioluminescent ou enzymatique.

**[0040]** Les méthodes de diagnostic *IN VITRO* dans lesquelles ces sondes nucléotidiques sont mises en oeuvre pour la détection de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques, telles que la perte d'hétérozygotie et le réarrangement génétique, au niveau des séquences nucléiques codant pour un polypeptide récepteur de l'IL-13 ou un fragment biologiquement actif, sont incluses dans la présente invention. Un tel type de méthode comprend :

- la mise en contact d'une sonde nucléotidique de l'invention avec un échantillon biologique dans des conditions permettant la formation d'un complexe d'hybridation entre ladite sonde et la susdite séquence nucléotidique, éventuellement après une étape préalable d'amplification de la susdite séquence nucléotidique ;
- la détection du complexe d'hybridation éventuellement formé ;
- éventuellement le séquençage de la séquence nucléotidique formant le complexe d'hybridation avec la sonde de l'invention.

**[0041]** Les sondes d'ADNc de l'invention sont en outre avantageusement utilisables pour la détection d'anomalies chromosomiques.

**[0042]** Les séquences nucléotidiques de l'invention sont également utiles pour la fabrication et l'utilisation d'amorces oligonucléotidiques sens et/ou antisens pour des réactions de séquençage ou d'amplification spécifique selon la technique dite de PCR (réaction de polymérisation en chaîne) ou toute autre variante de celle-ci.

**[0043]** Les séquences nucléotidiques selon l'invention ont par ailleurs des utilisations dans le domaine thérapeutique, pour la réalisation de séquences antisens, capables de s'hybrider spécifiquement avec une séquence d'acides nucléiques, y compris un ARN messager, utilisables en thérapie génique. L'invention a ainsi pour objet des séquences antisens capables d'inhiber, au moins partiellement, la production de polypeptides récepteurs de l'IL-13, tels que définis précédemment. De telles séquences sont avantageusement constituées par celles qui constituent le cadre de lecture codant pour l'IL-13R $\beta$  ou l'IL-13R $\alpha$  au niveau du transcript.

**[0044]** Elles sont plus particulièrement utilisables dans le traitement des allergies et de l'inflammation.

**[0045]** Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent par ailleurs être utilisées pour la production de polypeptides recombinants ayant une activité de récepteur de l'IL-13, tels que précédemment définis.

**[0046]** Ces polypeptides peuvent être produits à partir des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, selon des techniques de production de produits recombinants connues de l'homme du métier. Dans ce cas, la séquence nucléotidique utilisée est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire. L'hôte cellulaire utilisé peut être choisi parmi des systèmes procaryotes, comme les bactéries, ou eucaryotes, comme par exemple les levures, cellules d'insectes, CHO (cellules d'ovaires de hamster chinois) ou tout autre système avantageusement disponible dans le commerce. Un hôte cellulaire préféré pour l'expression des polypeptides de l'invention est constitué par la lignée fibroblastique COS-7 ou COS-3.

**[0047]** Les signaux contrôlant l'expression des polypeptides, tels que les promoteurs, les activateurs ou les séquences de terminaison, sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à répllication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi. De tels vecteurs seront préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standard, telles que par exemple l'électroporation.

**[0048]** Les vecteurs d'expression contenant au moins l'une des séquences nucléotidiques définies ci-dessus font également partie de la présente invention.

**[0049]** Dans le cas des cellules COS-7 ou COS-3 la transfection peut être réalisée à partir du vecteur pSE-1, comme décrit dans (17).

**[0050]** L'invention vise en outre les cellules hôtes transfectées par ces vecteurs d'expression. Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la répllication et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transfectée.

**[0051]** Ces cellules sont utilisables dans une méthode de production d'un polypeptide recombinant de séquence SEQ ID n° 2 ou SEQ ID n°4 ou dérivée, méthode elle-même comprise dans la présente invention, et caractérisée en ce que l'on cultive les cellules transfectées dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide recombinant de séquence SEQ ID n° 2 ou SEQ ID n°4, ou dérivée, et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.

**[0052]** Les procédés de purification utilisés sont connus de l'homme du métier. Le polypeptide recombinant peut être purifié à partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps mono ou polyclonaux spécifiques.

**[0053]** Les anticorps mono- ou polyclonaux capables de reconnaître spécifiquement l'IL-13R $\beta$  ou/et l'IL-13R $\alpha$  selon

la définition donnée précédemment font également partie de l'invention. Des anticorps polyclonaux peuvent être obtenus à partir du sérum d'un animal immunisé contre l'IL-13R $\beta$  ou/et l'IL-13R $\alpha$  selon les modes opératoires usuels.

[0054] Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus selon la méthode classique de culture d'hybridomes décrite par Köhler et Milstein (Nature, 1975, 256, 495-497).

[0055] Des anticorps avantageux sont des anticorps dirigés contre le domaine extracellulaire de l'IL-13R $\beta$  ou/et de l'IL-13R $\alpha$ .

[0056] Les anticorps selon l'invention sont par exemple des anticorps chimériques, des anticorps humanisés, des fragments Fab et F(ab')<sub>2</sub>. Ils peuvent également se présenter sous forme d'immunoconjugués ou d'anticorps marqués. Par exemple, ils peuvent être associés à une toxine, telle la toxine diphtérique ou à un produit radioactif. Ces immunotoxines peuvent dans ce cas constituer des agents thérapeutiques utilisables pour le traitement de certaines pathologies impliquant une surexpression de l'IL-13R $\beta$  ou/et de l'IL-13R $\alpha$ . Les anticorps de l'invention, en particulier les anticorps monoclonaux peuvent également être utilisés pour l'analyse par immunocytochimie des récepteurs de l'IL-13 sur des coupes de tissus spécifiques, par exemple par immunofluorescence, par marquage à l'or, ou à la peroxydase.

[0057] Ils peuvent ainsi être avantageusement mis en oeuvre dans toute situation où l'expression de l'IL-13R $\beta$  ou/et de l'IL-13R $\alpha$  doit être observée comme par exemple une surexpression anormale ou le suivi de la régulation de l'expression membranaire.

[0058] L'invention concerne donc également un procédé de diagnostic *IN VITRO* de pathologies corrélées à une expression anormale de l'IL-13R $\beta$  ou/et de l'IL-13R $\alpha$ , à partir de prélèvements biologiques susceptibles de contenir l'IL-13R $\beta$  ou/et de l'IL-13R $\alpha$  exprimé à un taux anormal, caractérisé en ce que l'on met en contact au moins un anticorps de l'invention avec ledit prélèvement biologique, dans des conditions permettant la formation éventuelle de complexes immunologiques spécifiques entre l'IL-13R $\beta$  ou/et de l'IL-13R $\alpha$  et le ou lesdits anticorps et en ce que l'on détecte les complexes immunologiques spécifiques éventuellement formés.

[0059] L'invention concerne également un kit pour le diagnostic *IN VITRO* d'une expression anormale de l'IL-13R $\beta$  ou/et de l'IL-13R $\alpha$  dans un prélèvement biologique ou/et pour la mesure du taux d'expression du récepteur de l'IL-13 dans ledit prélèvement comprenant :

- au moins un anticorps spécifique de l'IL-13R $\beta$  ou/et de l'IL-13R $\alpha$ , éventuellement fixé sur un support,
- des moyens de révélation de la formation de complexes antigènes/anticorps spécifiques entre l'IL-13R $\beta$  ou/et de l'IL-13R $\alpha$  et ledit anticorps et/ou des moyens de quantification de ces complexes.

[0060] Un autre objet de l'invention concerne une méthode pour l'identification et/ou l'isolement de ligands spécifiques de l'IL-13R $\beta$  ou/et de l'IL-13R $\alpha$  ou d'agents capables de moduler son activité, caractérisée en ce que l'on met en contact un composé ou un mélange contenant différents composés, éventuellement non-identifiés, avec des cellules exprimant à leur surface l'IL-13R $\beta$  ou/et de l'IL-13R $\alpha$ , dans des conditions permettant l'interaction entre le récepteur de l'IL-13 et ledit composé, dans le cas où celui-ci posséderait une affinité pour le récepteur, et en ce que l'on détecte et/ou isole les composés liés à l'IL-13R $\beta$  ou/et de l'IL-13R $\alpha$ , ou ceux capables d'en moduler l'activité biologique.

[0061] Dans un mode particulier, cette méthode de l'invention est adaptée à l'identification et/ou l'isolement d'agonistes et d'antagonistes de l'IL-13 pour son récepteur l'IL-13R $\beta$  ou/et de l'IL-13R $\alpha$ .

[0062] L'invention comprend également des compositions pharmaceutiques comprenant comme principe actif un polypeptide répondant aux définitions précédentes, préférentiellement sous forme soluble, associé à un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

[0063] Un tel polypeptide peut en effet agir en compétition avec l'IL-13R $\beta$  ou/et de l'IL-13R $\alpha$  exprimé à la surface cellulaire, et constituer de ce fait un antagoniste spécifique de la liaison de l'IL-13 à son récepteur, qui peut avantageusement être mis en oeuvre pour la synthèse d'un médicament destiné à moduler les réactions médiées par l'IL-13 dans des situations pathologiques.

[0064] L'invention comprend enfin une méthode de traitement thérapeutique d'affections liées à des réactions immunologiques médiées par l'IL-13, comprenant l'administration à un patient de l'IL-13R $\beta$  ou/et de l'IL-13R $\alpha$  (ou d'un de leurs fragments biologiquement actif), ou d'un composé capable d'en moduler spécifiquement l'activité biologique, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

[0065] D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description avec les exemples et les figures dont les légendes sont représentées ci-après.

## LEGENDE DES FIGURES

[0066]

- Figure 1 : caractérisation du récepteur IL-13R $\beta$  humain présent dans les cellules Caki-1.

- a) analyse de Scatchard (cadre inséré) de la courbe de saturation de l'IL-13 marquée à l' $[^{125}\text{I}]$ ;
- b) liaison de  $[^{125}\text{I}]\text{[Phe43]-IL-13-GlyTyrGlyTyr}$  en présence de concentration croissante d'IL-13 non marquée (•) et d'IL-4 (o);
- c) expériences de pontage ("cross-link") en utilisant de l'IL-13 radioactive en l'absence (coulée a) et en présence d'un excédent de 100 fois d'IL-13 non marquée (coulée b) ou d'IL-4 (coulée c);
- d) inhibition de la sécrétion d'IL-6 induite par l'IL-13 et l'IL-4 en présence d'un anticorps monoclonal spécifique de la chaîne IL-4R et de l'antagoniste de IL-4, Y124DIL-4.

- Figure 2 : Séquence nucléotidique de l'ADNc de l'IL-13R $\beta$ , et comparaison des séquences protéiques de l'IL-5R, l'IL-13R $\alpha$  mutine et de l'IL-13R $\beta$ .

- a) séquence nucléotidique de l'ADNc de l'IL-13R $\beta$ . Les acides aminés correspondant au peptide signal déduit de la séquence nucléique sont indiqués en italiques et ceux correspondant au domaine transmembranaire sont indiqués en caractères gras. Les sites de N-glycosylation potentiels (Asn-X-Ser/Thr) sont soulignés ;
- b) alignement des acides aminés des séquences de l'IL-13R $\beta$  et de l'IL-5R. Les séquences protéiques de l'IL-13R et IL-5R sont alignées comme décrit précédemment (24). Les résidus cystéine et le motif WSXWS caractéristiques de cette famille de récepteurs sont encadrés.

- Figure 3 : Profils d'expression de l'ARNm de l'IL-13R $\beta$ . L'ARN a été préparé à partir des cellules suivantes : Caki-1 (coulée a), A431 (coulée b), TF-1 (coulée c), U937 (coulée d), Jurkat (coulée e) et IM9 (coulée f).

- Figure 4 : Caractérisation du récepteur IL-13R $\beta$  recombinant de l'IL-13. Les cellules COS-7 sont transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R $\beta$  et utilisées pour :

- a) des études de liaison de l'IL-13 radiomarquée (cadre inséré), par analyse de Scatchard de la courbe de saturation;
- b) des expériences de pontage en utilisant de l'IL-13 radiomarquée en absence (coulée a) et en présence d'un excès de 100 fois d'IL-13 non marquée (coulée b) ;
- c-d) des expériences de cotransfection en utilisant l'IL-13R $\beta$  cloné, l'IL-4R (gp140) et la chaîne  $\gamma$  suivies par la liaison de l'IL-13 radiomarquée (c) ou de l'IL-4 (d). Les colonnes noires et blanches représentent respectivement la liaison spécifique de l'IL-13 et de l'IL-4.

- Figure 5 : Inhibition de la liaison de l'IL-13 sur l'IL-13R $\beta$  par la forme soluble du récepteur (IL-13R $\beta$ s) en expression transitoire.

L'expression d'IL-13R $\beta$ s dans le surnageant des cellules transfectées par 2034 est testée par inhibition de la liaison de l'IL-13 sur les cellules transfectées par l'IL-13R $\beta$  (2036). Les surnageants sont testés bruts en les diluant de moitié dans le ligand iodé.

2036 NSB : liaison non spécifique en présence d'un excès d'IL-13 non marquée 2036 BT : liaison totale sur cellules transfectées avec le 2036

2036 + sgt 2034 : liaison sur cellules transfectées avec le 2036 en présence de surnageant de cellules transfectées avec le 2034.

2036 + sgt pSE1 : contrôle

- Figure 6 : Inhibition de la liaison de l'IL-13 sur l'IL-13R $\beta$  par la forme soluble du récepteur (IL-13R $\beta$ s) sur des lignées stables.

T2036-22 : liaison totale sur le clone IL-13R $\beta$  (2036-22) sans présence de surnageant de clone sécrétant l'IL-13R $\beta$ s (référence 100 %)

2034-4

2034-6

2034-19 \_ 4 clones IL-13R $\beta$ s

2034-21

1274-20 : en présence de surnageant de cellules CHO n'exprimant pas l'IL-13R $\beta$ s (contrôle).

- Figure 7 : Séquence nucléotidique de l'ADNc de l'IL-13R $\alpha$  et comparaison des séquences protéiques de l'IL-13R $\alpha$  humain et de l'IL-13R $\alpha$  murin

- a) Séquence nucléotique de l'ADNc de l'IL-13R $\alpha$ . Les acides aminés correspondant au peptide signal déduit de la séquence nucléique sont soulignés par un trait pointillé et ceux correspondant au domaine transmem-



branaires sont soulignés par un double trait. Les sites de N-glycosylation potentiels (Asn-X-Ser/Thr) sont encadrés.

b) Alignement des acides aminés de l'IL-13R $\alpha$  humain et de l'IL-13R $\alpha$  murin. Les séquences protéiques de l'IL-13R $\alpha$  humain et de l'IL-13R $\alpha$  murin sont alignés comme décrit précédemment (24). Les résidus cystéines et le motif WSXWS caractéristiques de cette famille de récepteurs sont encadrés.

- Figure 8 : Caractérisation du récepteur IL-13R $\alpha$  recombinant de l'IL-13.

Les cellules CHO ou COS-3 transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R $\alpha$  ou/et de l'IL-4R et utilisées pour:

a) des études de liaison de l'IL-13 marquée à l'iode 125, par analyse de Scatchard de la courbe de saturation avec des cellules CHO transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R $\beta$  (figure A), transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R $\beta$  et l'ADNc de l'IL-4R (figure B), transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R $\alpha$  (figure C) et transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R $\alpha$  et l'ADNc de l'IL-4R (figure D).

b) des expériences de compétitions de liaisons de l'IL-13 sur des cellules CHO transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R $\beta$  (figure E), transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R $\beta$  et l'ADNc de l'IL-4R (figure F), transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R $\alpha$  (figure G) et transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R $\alpha$  et l'ADNc de l'IL-4R (figure H). Les colonnes blanches et hachurées représentent respectivement la liaison spécifique de l'IL-13 radiomarquée en présence d'un excès (1000 fois plus) d'IL-13 ou d'IL-4, les colonnes noires représentent la liaison totale.

- Figure 9 : comparaison de la mobilité électrophorétique dans l'EMSA d'extraits cellulaires exprimant le récepteur de l'IL-4 seul (CHO-4), le récepteur de l'IL-13R $\alpha$  seul (CHO-13) ou les récepteurs combinés IL-13R $\alpha$  et l'IL-4R (CHO-4-13) après activation des cellules CHO en présence d'IL-4 ou d'IL-13 (4 ou 13), c représentant le témoin non activé..

## MATERIELS ET METHODES

### Expériences de liaison et de pontage :

[0067] Les expériences de liaison et de pontage sont réalisées comme décrit pour [<sup>125</sup>I][Phe43]-IL-13-GlyTyrGlyTyr (17).

### Induction de la sécrétion d'IL-6 :

[0068] Les cellules Caki-1 (ATCC HTB46) sont mises dans des plaques de 24 puits à une densité de 5.10<sup>4</sup> cellules/ puits et après 3 jours de culture des monocouches confluentes sont lavées trois fois avec du milieu DMEM sans sérum de veau foetal. La stimulation des cellules Caki-1 est réalisée avec 30 ng/ml d'IL-4 ou d'IL-13 en absence ou en présence de Y124DIL-4 ou d'un anticorps monoclonal anti-gp140. La quantité d'IL-6 libérée dans le milieu de culture après 24 heures d'incubation est mesurée par une technique ELISA (Innotest, France).

### Isolement et analyse de l'ADNc de l'IL-13R $\beta$ humain :

[0069] L'ARN total a été extrait des cellules Caki-1 comme décrit précédemment (25). L'ARN poly(A) est isolé des ARN totaux avec des billes magnétiques recouvertes d'oligo(dT)<sub>25</sub>(Dyna). Une banque d'ADNc contenant 2.10<sup>5</sup> clones a été construite en utilisant la procédure d'amorces adaptateurs (26) et le vecteur pSE-1 (27). La stratégie de clonage pour l'expression qui a été utilisée a été décrite précédemment (17).

### Obtention de l'ADNc de l'IL-13R $\beta$ humain :

[0070] Les échantillons d'ARN sont copiés avec la reverse transcriptase et soumis à une PCR (réaction de polymérisation en chaîne) en utilisant une amorce sens correspondant à la séquence + 489 à + 490 et une amorce antisens correspondant à + 52 à + 71 (la numération est faite sur la base de la séquence de l'ADNc montrée sur la figure 2). Les produits amplifiés par PCR sont hybridés avec une sonde complémentaire des séquences + 445 à + 461 de l'ADNc. Les marqueurs de taille sont indiqués à la gauche de la figure.

**Isolement et analyse de l'ADNc de l'IL-13 R $\alpha$  humain :**

**1) Préparation de la sonde IL-13 R $\alpha$  murin**

**5 a) Culture des cellules B9 (28)**

**[0071]** Les cellules B9 sont cultivées en milieu RPMI ( Gibco ) supplémenté de 10% de sérum de veau foetal et 50  $\mu$ g / ml de gentamycine.

**10 b) Préparation de l' ARN des cellules B9.**

**[0072]** Les cellules sont lavées deux fois avec du tampon PBS ( phosphate buffer saline, référence 04104040-GI-BCO-BRL). Après centrifugation 10 minutes à 1000 rpm, le culot cellulaire est mis en suspension dans le tampon de lyse de composition suivante : guanidine-thiocyanate 4M ; citrate de sodium 25 mM pH 7 ; sarcosyl 0.5% ;  $\beta$ 2-mercaptoéthanol 0.1 M.

**[0073]** La suspension est soniquée à l'aide d'un sonicateur ultra turax no 231256 (JANKE et KUNDEL) à puissance maximale pendant une minute. On ajoute de l'acétate de sodium pH 4 jusqu'à 0.2 M. La solution est extraite avec un volume d'un mélange de phénol / chloroforme ( v / v ; 5 / 1 ).

**[0074]** On précipite à - 20°C l'ARN contenu dans la phase aqueuse à l'aide d'un volume d'isopropanol. Le culot est resuspendu dans le tampon de lyse. La solution est à nouveau extraite avec un mélange phénol / chloroforme et l'ARN est précipité avec de l'isopropanol. Après lavage du culot avec de l'éthanol 70% puis 100%, l'ARN est resuspendu dans de l'eau.

**c) Préparation de l'ADN complémentaire.**

**[0075]** L'ADNc est préparé à partir de 5  $\mu$ g d'ARN total en utilisant une amorce poly T12. On incube l'ARN total dans un volume de 30 $\mu$ l de tampon : Tris HCl 50 mM pH 8.3, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, DTT 10 mM, KCl 40 mM, contenant 0.5 mM de chacun des désoxynucléotides triphosphates et 30 unités de Rnasin (Promega), une heure à 37 °C, puis 10 minutes à 50 °C, puis de nouveau 10 minutes à 37 °C, avec 200 unités de l'enzyme transcriptase inverse Rnase H- (Gibco-BRL référence 8064A). La réaction est interrompue en chauffant 10 minutes à 65 °C.

**d) Amplification spécifique d'un fragment de l'ADNc du IL 13R $\alpha$  de souris par la technique de PCR.**

**[0076]** La polymérisation est réalisée avec 6  $\mu$ l d'ADNc dans 50  $\mu$ l final avec le tampon de composition suivante : Tris HCl 10mM pH 8.3, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, KCl 50 mM, 4 dNTP 0.2 mm, 2  $\mu$ g / ml de chacune des deux amorces nucléiques et de 2.5 u de TAQ ADN polymérase ( Beckman). Les couples d'amorces ont été choisis sur la séquence publiée par Hilton (22).

**Amorce sens : nucléotide 249 à 268**

**5' AGAGGAATTACCCCTGGATG 3'**

**Amorce anti-sens : nucléotide 1256 à 1275**

**5' TCAAGGAGCTGCTTTCTTCA 3'**

**[0077]** La réaction est réalisée durant 30 cycles 1 minute à 94°C, 1 minute à 58°C, 4 minutes à 72°C, suivi d'un dernier cycle de 10 minutes à 72°C.

**e) Purification du produit d'amplification PCR.**

**[0078]** Après migration sur un gel d'agarose 1% (Sigma) en tampon TAE (Tris HCl 40 mM, EDTA 1mM pH7.9) pendant

1 heure à 100 volts, le gel est coloré en présence de bromure d'ethidium à  $1\mu\text{g} / \text{ml}$  dans le même tampon. La bande correspondant au produit d'amplification (fragment d'ADNc de 1027 paires de bases (pB) de l'IL13R $\alpha$ ) est extraite en utilisant un kit Glass Max (Gibco).

5 f) Préparation de la sonde.

[0079] 25 ng du fragment de 1027 paires de bases (pB) d'ADNc purifié correspondant au récepteur IL-13R $\alpha$  de souris sont marqués au phosphore 32 avec le kit BRL "Random Primers DNA labelling systems" à une activité spécifique de  $2.4 \times 10^9$  dpm /  $\mu\text{g}$  ; alternativement, 100 ng sont marqués par Nick-translation en utilisant le kit Boehringer à une activité spécifique de  $4 \times 10^8$  dpm /  $\mu\text{g}$ .

2) Isolement et analyse de l'ADNc de l'IL-13R $\alpha$  humain

a) Préparation de l'ARN total

15

[0080] L'ARN total a été extrait des cellules Cakil comme décrit précédemment dans le paragraphe 1b.

b) Purification de l'ARN messager (fraction polyA+).

20 [0081] La purification de la fraction polyA+ de l'ARN est réalisée à l'aide du kit Dynabeads oligo (dT) 25 de DYNAL (référence 610.05) suivant le protocole préconisé par le fabricant. Le principe est basé sur (utilisation de billes polystyrène super-paramagnétique sur lesquelles est attaché un oligonucléotide poly (dT) 25. La fraction polyA+ est hybridée sur l'oligonucléotide (dT) 25 couplé aux billes que l'on piège sur un support magnétique.

25 c) Northern blot.

[0082] 5  $\mu\text{g}$  d'ARN messager poly A+ sont déposés sur gel dénaturant 8% formaldéhyde, 1% agarose en tampon MOPS (10mM pH 7.4, EDTA 0.5 mM). Après migration et transfert sur membrane hybond N+ (Amersham) en tampon 20 X SSC, l'ARN est fixé en chauffant au four à 80°C sous vide. La membrane est alors préhybridée 2 heures à 42°C dans le tampon suivant : 1 M NaCl ; 30% formamide; 1% SDS ; 5 X Denhart's ; 100  $\mu\text{g} / \text{ml}$  d'ADN de sperme de saumon. Après 2 heures de préhybridation, la membrane est hybridée dans le même tampon avec une concentration de sonde IL-13R $\alpha$  de souris préparée par "random priming" de 2.5  $10^6$  dpm / ml, pendant 16 heures. La membrane est ensuite lavée 2 fois pendant 30 minutes dans le tampon 2 x SSC 0.1% SDS à température ambiante puis pendant 2 heures à 50°C dans le même tampon. Après 4 jours d'exposition dans une cassette (Molecular Dynamics), le northern blot est analysé à l'Instant Imager (Molecular Dynamics). Un transcrit majoritaire de 4200 paires de bases (pB) et un doublet de 1500 pB et 2000 pB sont détectés dans les cellules Cakil, U373 et U937.

Caractérisation des propriétés de l'IL-13R $\beta$  et de l'IL-13R $\alpha$  humain :

40 [0083] Les cellules COS-7 ou CHO sont transfectées dans des boîtes de Pétri comme décrit précédemment (17). 24 heures plus tard, les cellules sont trypsinisées et mises en culture dans des plaques de 24 puits à une densité de  $8.10^4$  cellules/puits. Après une culture de 48 heures à 37°C, les cellules sont utilisées pour des expériences de liaison (des essais réalisés en triplicata montrent une variation de moins de 10 %) avec de l'IL-13 iodée comme décrit (17). Pour la transfection, les cellules COS-7 ou CHO ont été transfectées dans des plaques de 25 cm<sup>2</sup> en utilisant 0,6 mg de différents plasmides. Après 24 heures, les monocouches cellulaires sont trypsinisées et mises en culture dans des plaques à 12 puits à raison de  $8.10^4$  cellules/puits. Trois jours plus tard, les expériences de liaison et de compétition sont réalisées avec de l'IL-13 marquée et avec de l'IL-13 et/ou de l'IL-4 non marquées. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences réalisées indépendamment.

45 [0084] Comparaison des mobilités électrophorétiques dans l'EMSA des extraits nucléiques de cellules exprimant l'IL-13R $\alpha$  et/ou l'IL-4R humains : 2.10<sup>6</sup> cellules CHO sont réparties dans des boîtes de Pétri de diamètre 10 cm. 24 heures plus tard, les cellules sont transfectées avec 6  $\mu\text{g}$  d'ADN plasmide (34). Après 48 heures, les cellules sont incubées à 37°C pendant 30 minutes dans 3 ml de milieu avec ou sans IL-13 ou IL-4 à une concentration de 100 ng par ml. Les cellules sont ensuite rincées deux fois avec un tampon PB5-0,5 mM d'EDTA puis resuspendues dans 1,2 ml de PB5. Les cellules sont ensuite centrifugées et les extraits cellulaires préparés comme décrit dans (35). Les EMSA sont ensuite réalisées comme décrit dans (36) avec de 10 à 20  $\mu\text{g}$  d'extraits cellulaires et avec une sonde oligonucléotidique radiomarquée au <sup>32</sup>P (50000-100000 cpm), sonde correspondant à l'élément Ce du promoteur Ce humain (37). La sonde oligonucléotidique synthétisée présente la séquence suivante :

**5'-GATCCACTTCCCAAGAACAGA-3'.**

5

**EXEMPLES****EXEMPLE 1:****10 Analyse de l'expression de l' IL-13R $\beta$  humain à la surface des cellules Caki-1**

[0085] Il a récemment été découvert que des cellules de carcinome rénal humain exprimaient en plus des récepteurs communs à l'IL-4 et à l'IL-13, un large excès de récepteurs spécifiques de l'IL-13 (21). Sur la base de ces résultats, un échantillon de lignées cellulaires de carcinome humain a été étudié pour la fixation de l'IL-13 comme décrit précédemment (17). Une lignée particulière, Caki-1 (ATCC HTB46), qui exprime un nombre particulièrement important de sites de liaisons pour l'IL-13, a été analysée plus en détail. Les courbes de Scatchard obtenues à partir d'expériences de saturation montrent la présence de sites de liaison avec une Kd de  $446 \pm 50$  pM et une capacité de  $7,2 \cdot 10^4$  récepteurs/cellule (figure 1a). Dans des expériences de compétition, l'IL-13 non marquée déplace totalement l'IL-13 marquée d'une façon dose dépendante, alors que l'IL-4 déplace avec une haute affinité environ 10 % de l'IL-13 marquée. Des concentrations plus importantes d'IL-4 (supérieures à 100 nM) ne déplacent pas les 90 % restants d'IL-13 liée (figure 1b).

[0086] Ces résultats sont en concordance avec l'existence de deux sites l'un partagé par les deux cytokines, l'autre spécifique de l'IL-13. Les expériences de pontage par affinité de l'IL-13 montrent un complexe d'environ 70 kDa, qui coïncide avec le complexe observé dans des expériences de pontage similaire avec l'IL-13 dans différents types cellulaires (17,21). L'IL-13 marquée est complètement déplacée du complexe par l'IL-13 mais pas par l'IL-4, ce qui est accord avec les expériences de compétition (figure 1c).

**EXEMPLE 2 :****30 Analyse de la sécrétion d'IL-6 induite par l'IL-4 ou l'IL-13.**

[0087] Les auteurs de l'invention ont analysé la sécrétion induite par l'IL-4 ou l'IL-13 sur des cellules Caki-1. Les deux cytokines induisent la sécrétion de niveaux similaires d'IL-6, et la sécrétion est inhibée par des anticorps spécifiques de la chaîne  $\alpha$  de l'IL-4R et par l'antagoniste Y124DIL-4 (figure 1d). Ceci suggère que les récepteurs partagés par les deux cytokines dans les cellules Caki-1 sont responsables de l'induction de la sécrétion d'IL-6. Des résultats similaires sont observés quand la phosphorylation du complexe protéique IRS1/4PS (18) induite - par l'IL-4 et l'IL-13 est analysée en présence ou en absence d'anticorps anti-IL-4R et d'antagoniste de l'IL-4.

[0088] Ces résultats pris dans leur ensemble suggèrent que le complexe récepteur IL-4/IL-13 exprimé dans les cellules Caki est identique à ce qui avait été précédemment décrit et que la protéine liant l'IL-13 (IL-13R $\beta$ ) qui est surexprimée, est un composant du récepteur responsable de la reconnaissance de l'IL-13 dans un complexe fonctionnel qui inclut IL-4R.

[0089] Ces cellules ont donc été utilisées comme source d'ARN messager pour le clonage de cette entité liant l'IL-13.

**EXEMPLE 3:**

45

**Clonage de la sous unité primaire du récepteur de l'IL-13 (IL-13R $\beta$ )**

[0090] La stratégie de clonage et d'expression qui a été utilisée a été précédemment décrite (17). Une banque d'ADNc contenant  $2 \cdot 10^5$  clones recombinants a été construite (26) à partir des cellules Caki-1. La banque a été divisée en lots de 1000 ADNc, dont l'ADN de chaque lot sous forme de plasmide a été introduit dans des cellules COS-7 (29). La liaison d'IL-13 marquée aux cellules COS-7 transfectées permet d'identifier les lots de clones codant un récepteur de l'IL-13. Les lots positifs ont été répartis et recriblés jusqu'à l'identification d'un clone unique capable de réaliser la synthèse d'une protéine de surface cellulaire apte à lier l'IL-13. Deux ADNc de l'IL-13R $\beta$  indépendants ont été finalement isolés. La séquence nucléotidique complète de l'ADNc de l'IL-13R $\beta$  et la séquence d'acides aminés qui en est déduite sont montrées sur la figure 2a. L'ADNc a une longueur de 1298 bases en excluant la queue poly-A et a une courte région non traduite en 3' de 106 bases. Un signal canonique de polyadenylation AATAAA se trouve à la place prévue. Le cadre de lecture ouvert entre les nucléotides 53 et 1192 définit un polypeptide de 380 acides aminés. La séquence code pour une protéine membranaire avec un peptide signal potentiel, un seul domaine transmembranaire

et une courte queue intracytoplasmique.

[0091] 4 sites de N-glycosylation potentiels sont localisés dans la région extracellulaire. Il est important de noter que deux motifs consensus considérés comme des signatures de la famille des récepteurs de cytokine de type II (30) sont aussi présents, le premier étant dérivé d'une structure en boucle de pont disulfure N-terminal, le second étant le motif de type WSXWS localisé à l'extrémité C-terminale de la région extra cellulaire. La très courte séquence cytoplasmique pourrait expliquer pourquoi c'est seulement le complexe récepteur partagé par l'IL-4 et par l'IL-13 dans les cellules Caki qui transduit un signal dans la cellule.

[0092] Des études d'alignement démontrent des homologies avec la chaîne  $\alpha$  de l'IL-5R humain (51 % de similarité et 27 % d'identité, figure 2b) et à un degré moindre, avec le récepteur de la prolactine. Il est intéressant de noter que le complexe IL-5R est constitué d'une chaîne  $\alpha$  qui lie l'IL-5 mais qui a besoin d'une autre protéine, la chaîne  $\beta$  partagée avec les récepteurs de l'IL-3 et du GM-CSF, pour former un récepteur de haute affinité qui est capable de transduire un signal (31).

#### EXEMPLE 4:

##### Détection des ARN messagers de l'IL-13R $\beta$ humain dans différentes lignées cellulaires

[0093] De façon surprenante, dans les cellules Caki-1 des quantités similaires d'ARN messagers de l'IL-13R $\beta$  et IL-4R sont détectées par des analyses de northern blot bien qu'un large excès d'IL-13R $\beta$  soit exprimé. Cette observation suggère qu'il y a une plus forte traduction de cet ARNm par rapport au transcript de l'IL-4R et explique l'absence de détection de l'ARNm de l'IL-13R $\beta$  dans les lignées cellulaires exprimant un faible nombre de sites de liaison de l'IL-13. Des analyses par RT-PCR (figure 3) montrent que le transcript trouvé dans les cellules Caki-1 est aussi présent à des degrés inférieurs dans la lignée kératinocytaire A431, les cellules prémyéloïdes TF-1, les cellules prémyélocytiques U937, et la lignée cellulaire B IM9. Aucun transcript n'est détecté dans la lignée cellulaire T Jurkat ni dans la lignée cellulaire pré-B NALM6. Ces résultats sont en accord avec des études de liaison de l'IL-13 sur ces mêmes lignées précédemment décrites par les auteurs de la présente invention (17), et avec les cibles biologiques connues de l'IL-13.

#### EXEMPLE 5 :

##### Analyses de liaison réalisées sur des cellules COS-7 transfectées avec l'ADNc de l'IL-13R $\beta$ humain

[0094] Les cellules COS-7 transfectées avec l'ADNc isolé codant pour l'IL-13R $\beta$  lient spécifiquement l'IL-13 marquée. L'analyse de Scatchard de la courbe de saturation montre un seul site composant avec une Kd d'une valeur de  $250 \pm 30$  pM et une capacité de liaison maximale de  $5,6 \cdot 10^5$  récepteurs/cellule (figure 4a).

[0095] L'affinité du récepteur recombinant est en bon accord avec la valeur de Kd de 446 pM pour l'IL-13R $\beta$  dans les cellules Caki-1 et pour ce qui a été décrit dans plusieurs autres cellules (17). Donc, malgré l'homologie de séquence avec la chaîne  $\alpha$  de l'IL-5R, le récepteur cloné se comporte différemment puisqu'il n'a pas besoin d'une seconde chaîne pour reconstituer un site de liaison de haute affinité.

[0096] Il est intéressant de noter que la protéine liant l'IL-15 récemment décrite possède de la même façon la caractéristique de lier avec une forte affinité l'IL-15, en l'absence des deux autres composants du complexe IL-15R (32).

[0097] Dans des expériences de compétition, l'IL-13 est capable d'inhiber la liaison de l'IL-13 marquée au récepteur cloné, avec une constante d'inhibition (Ki) de  $1,5 \pm 0,5$  nM, alors que l'IL-4 n'inhibe pas la liaison. La pharmacologie du récepteur cloné est donc similaire à celle de l'IL-13R $\beta$  présent dans les cellules Caki-1. Des expériences de pontage montrent une bande radiomarquée de 70 kDa. Cette bande a la même mobilité que celle observée dans les cellules Caki ainsi que dans d'autres cellules (17). Ce complexe correspond très probablement à la bande de 60-70 kDa observée en plus de la bande de 140 kDa de l'IL-4R dans les expériences de pontage réalisées avec l'IL-4 marquée. Ceci pourrait aussi suggérer qu'il existe une forte interaction entre les deux protéines dans le complexe récepteur fonctionnel. Les auteurs de la présente invention ont donc vérifié si l'IL-13R $\beta$  et l'IL-4R interagissent dans la membrane cellulaire pour reconstituer un récepteur qui permet une compétition croisée des deux cytokines. Les résultats d'expérience de coexpression sont montrés dans la figure 4,c et d.

[0098] Il apparaît clairement que l'expression des deux récepteurs soit isolée soit simultanée, résulte en un grand nombre de récepteurs qui reconnaissent spécifiquement l'une ou l'autre des deux cytokines. Toutefois, lorsqu'ils sont exprimés ensemble, un petit nombre de récepteurs (5 à 10 %) est capable de reconnaître les deux cytokines. La cotransfection de la chaîne  $\gamma_c$  avec l'IL-4R et l'IL-13R $\beta$  ne procure pas une augmentation dans le nombre de sites de liaison partagés. Ces résultats suggèrent que les chaînes de l'IL-13R $\beta$  et IL-4R peuvent interagir l'une avec l'autre dans la membrane cellulaire pour reconstituer un récepteur pour lequel l'IL-13 et l'IL-4 peuvent être en compétition. Le faible pourcentage de récepteurs reconstitués est un argument en faveur de la présence d'une autre protéine (IL-13R $\alpha$ ) en quantités limitantes dans les cellules COS, nécessaire pour la reconstitution du complexe récepteur auquel

se lie en compétitivité l'IL-13 et l'IL-4.

[0099] Les résultats obtenus dans les expériences de transfection avec la chaîne  $\gamma$  démontrent que cette protéine n'est pas le facteur limitant qui avait été suggéré auparavant (15). Cette conclusion est aussi supportée par l'absence d'ARN messager de  $\gamma$  dans les cellules Caki-1 (21).

[0100] Une autre raison possible pour expliquer le faible nombre de récepteurs reconstitués est l'existence d'une stoechiométrie incorrecte des deux protéines dans la membrane cellulaire. Toutefois, des cotransfections utilisant des quantités relatives différentes d'IL-4R et d'IL-13R $\beta$  ne montrent pas de différence majeure dans le nombre de récepteurs reconstitués. La possibilité qu'il existe un autre IL-13R avec une plus forte capacité à interagir avec IL-4R, a été confirmée chez la souris (22) et chez l'homme par l'isolement de l'ADNc de l'IL-13R $\alpha$  (cf. EXEMPLE 7). Il doit être noté que l'expression de  $\gamma$  améliore la liaison de l'IL-4 comme cela a été précédemment décrit (19) mais diminue la liaison de l'IL-13, suggérant une interaction complexe entre les différentes chaînes.

#### EXEMPLE 6:

##### Etude de l'inhibition de la liaison de l'IL-13 à son récepteur membranaire par un récepteur sous forme soluble.

[0101] On décrit les résultats en expression transitoire (figure 5) ou sur les lignées stables (figure 6).

[0102] Les deux séquences d'ADNc, codant pour l'IL-13R $\beta$  et pour l'IL-13R $\beta$ s sont insérées dans le vecteur p7055 à la place de l'ADNc de l'IL-2 (33). Les plasmides résultants sont nommés 2036 et 2034 respectivement.

##### a) Expression transitoire

[0103] Les cellules CHO sontensemencées en plaques 12 puits à  $3 \cdot 10^5$  cellules/puits et transfectées le lendemain par la méthode DEAE-Dextran comme pour les cellules COS, soit avec le plasmide 2036 ou 2034, soit avec le plasmide pSE-1 vide comme témoin.

[0104] Les cellules sont cultivées pendant trois jours de façon à permettre une accumulation de l'IL-13R $\beta$ s dans le sumageant des cellules transfectées avec le plasmide 2034 et une bonne expression de l'IL-13R $\beta$  dans la membrane des cellules transfectées avec le plasmide 2036.

[0105] Le sumageant des cellules transfectées avec l'IL-13R $\beta$ s (2034) ou le témoin négatif (pSE-1 vide) est alors prélevé et les cellules transfectées avec l'IL-13R $\alpha$  sont utilisées pour l'étude de l'inhibition de la liaison de l'IL-13.

[0106] La liaison de l'IL-13 à la surface des CHO exprimant l'IL-13R $\beta$  (2036) est mesurée en présence ou non de ces sumageants bruts dilués de moitié avec le radioligand ou en présence d'un excès d'IL-13 non radiomarquée (NSB). La liaison s'effectue sur les cellules entières dans un volume final de 500  $\mu$ l avec 300 pM de radioligand, en triplicata.

##### b) Lignées stables

[0107] Deux lignées stables de CHO transformées sont obtenues par transfection avec les séquences codantes de l'IL-13R $\beta$  complet (polypeptide de 380 résidus) ou de l'IL-13R $\beta$  sous forme soluble (IL-13R $\beta$ s, polypeptide tronqué, correspondant aux résidus 1 à 337 de l'IL-13R $\beta$ ). Ces séquences sont insérées dans le vecteur p 7055.

[0108] Les cellules CHO-DHFR<sup>-</sup> sont transfectées avec les plasmides 2036 (IL-13R $\beta$ ) et 2034 (IL-13R $\beta$ s) et les clones recombinants sélectionnés comme décrit précédemment (33).

[0109] L'un des clones CHO-IL-13R $\beta$  (CHO 2036) obtenus, présentant 2 à  $5 \cdot 10^5$  sites par cellules est ensemencé en plaque 12 puits à une densité de  $10^5$  cellules par puits et les cellules sont utilisées deux jours près pour des expériences de liaison en présence ou non d'IL-13R $\beta$ s.

[0110] Pour cela, les clones CHO-IL-13R $\beta$ s (CHO 2034) sont ensemencés en boîtes de 6 cm, en triplicata à  $5 \cdot 10^5$  cellules par boîte. Après 3 jours d'accumulation dans le milieu de culture, le milieu (5 ml par boîte) est prélevé pour les études d'inhibition de liaison de l'IL-13 sur l'IL-13R $\beta$  du clone CHO 2036. De la même façon, le sumageant de cellules CHO n'exprimant pas l'IL-13R $\beta$  soluble est prélevé.

[0111] La liaison de l'IL-13 à la surface du clone CHO 2036-22 est mesurée en présence ou non de ces sumageants bruts dilués de moitié avec le radioligand, ou en présence d'un excès d'IL-13 non radiomarquée (NSB). La liaison s'effectue en triplicata, sur les cellules entières, dans un volume de 500  $\mu$ l avec 300 pM de radioligand.

[0112] Les histogrammes des figures 5 et 6 représentent l'inhibition de la liaison de l'IL-13 sur l'IL-13R $\beta$  par l'IL-13R $\beta$ s. Une inhibition de la liaison de l'IL-13 à son récepteur peut s'observer sur plusieurs clones.

## EXEMPLE 7

Clonage du récepteur IL13R $\alpha$  humain.

- 5 a) Préparation de la banque d'ADNc à partir des ARN messagers polyA+ de cellules Caki1.

[0113] A partir de 0.5  $\mu$ g d'ARN messager polyA+, on prépare l'ADN complémentaire simple brin marqué au  $^{32}$ P. dCTP (L'ADN complémentaire obtenu présente une activité spécifique de 3000 dpm/ng) avec l'amorce synthétique de séquence suivante (comportant un site BamH1):

10 **5' < GATCCGGGCCCTTTTTTTTTTTT <3'**

- 15 dans un volume de 30  $\mu$ l de tampon suivant :

[0114] Tris HCl 50mM pH 8.3, MgCl<sub>2</sub> 6mM, DTT 10 mM, KCl 40 mM, contenant 0.5 mM de chacun des désoxynucléiques triphosphates, 30  $\mu$ Ci de dCTP  $\alpha$ <sup>32</sup>P et 30 U de Rnasin (Proméga). Après une heure d'incubation à 37°C, puis 10 minutes à 50°C, puis de nouveau 10 minutes à 37°C, avec 200 unités de l'enzyme transcriptase inverse Rnase H- (Gibco-BRL), on ajoute 4  $\mu$ l d'EDTA. La matrice ARN est ensuite dégradée en ajoutant 6  $\mu$ l d'une solution de NaOH

- 20 2, l'incubation durant 5 minutes à 65°C.

[0115] Afin d'éliminer l'amorce synthétique, on purifie l'ADN complémentaire sur une colonne de 1 ml de séphacryl S400 (Pharmacia), équilibrée dans du tampon TE. Les deux premières fractions radioactives sont regroupées et précipitées avec 1/10 de volume d'une solution d'acétate d'ammonium 10M et 2.5 volumes d'éthanol, ceci après une extraction au chloroforme. On allonge ensuite l'ADNc en 5' en ajoutant une "queue" homopolymérique de dG avec 20

25 unités de l'enzyme terminale transférase (Pharmacia 27073001). Puis, on incube dans 20  $\mu$ l de tampon de composition suivante : Tris HCl 30 mM pH 7.6 ; chlorure de cobalt 1 mM ; acide cacodylique 140 mM ; DTT 0.1 mM ; dGTP 1mM, pendant 15 minutes à 37°C, puis on ajoute 2  $\mu$ l d'EDTA 0.5 M. On retraits de nouveau à la soude sans chauffer, on repurifie sur colonne S400, on extrait au chloroforme et on précipite à l'éthanol. Le culot est dissous dans 33  $\mu$ l de tampon TE. L'étape suivante consiste à apparier le vecteur de clonage pT7T3-18 auquel on a préalablement ajouté

30 une queue homopolymérique de dC après coupure par PstI, l'ADNc et l'adaptateur. On met en présence l'ADNc (33  $\mu$ l) avec 75 ng de vecteur pT7/T3-18 (5 $\mu$ l), 120 ng de l'adaptateur (1 $\mu$ l) de séquence suivante (comportant un site ApaI),

**5' AAAAAAAAAAAAAAGGGCCCG 3'**

- 35 10  $\mu$ l d'une solution de NaCl 200 mM, et on incube pendant 5 minutes à 65°C puis on laisse refroidir le mélange réactionnel jusqu'à température ambiante. L'étape suivante consiste à ligaturer le vecteur de clonage et l'ADNc simple brin dans un volume réactionnel de 100  $\mu$ l avec 32.5 unités de l'enzyme ADN ligase du phage T4 (Pharmacia) pendant une nuit à 15°C dans un tampon de composition : Tris HCl 50 mM pH 7.5 ; MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ATP 1mM. Les protéines
- 40 sont ensuite éliminées par extraction au phénol suivie d'une extraction au chloroforme, puis on ajoute 1/10 de volume d'une solution d'acétate d'ammonium 10 mM et 2.5 volumes d'éthanol. On centrifuge, le culot est repris dans le tampon de composition Tris acétate 33 mM pH 7.9, acétate de potassium 62.5mM, acétate de magnésium 1 mM et DTT 1mM; le deuxième brin d'ADNc est synthétisé dans un volume de 30  $\mu$ l avec 30 unités de l'enzyme ADN polymérase du phage T4 (Pharmacia) et un mélange de 1 mM des quatre désoxynucléotides triphosphates ainsi que deux
- 45 unités de la protéine du gène 32 du phage T4 (Pharmacia) pendant une heure à 37°C. On extrait au phénol et on en élimine les traces en déposant sur une colonne P10 (Biogel P10-200-400 mesh - référence 15011050 - Biorad).

[0116] La dernière étape consiste à transformer des cellules *E. Coli* MC 1061 par électroporation de l'ADN recombinant à l'aide d'un appareil Biorad Gene Pulser utilisé à 2.5 kV dans les conditions prescrites par le fabricant, puis on cultive les bactéries pendant une heure dans du milieu LB de composition

- 50 bactotryptone 10 g/l; extrait de levure 5 g/l; NaCl 10 g/l.

[0117] On détermine le nombre de clones indépendants obtenus en étalant une dilution au 1/1000 ème de la transformation après une heure d'incubation sur une boîte de milieu LB additionné de 1.5 % d'agar (p/v) et de 100  $\mu$ g / ml d'ampicilline' appelé par la suite milieu LB gélosé.

[0118] Le nombre de clones indépendants obtenus est de 1 million.

- 55 b) Criblage de la banque d'ADNc.

[0119] La totalité de la banque est étalée sur du milieu gélose (boîtes de Pétri de diamètre de 150 mm) revêtu de

membranes Biodyne A (PAUL référence BNGG 132). Après une nuit à 37°C, les clones sont transférés par contact sur de nouvelles membranes. Ces dernières sont traitées en les déposant sur du papier Wathman 3 MM imbibé des solutions suivantes : NaOH 0.5 N, NaCl 1.5 M pendant 5 minutes puis Tris HCl 0.5 M pH 8, NaCl 1.5 M pendant 5 minutes. Après un traitement à la protéinase K dans le tampon suivant : Tris HCl 10mM pH8, EDTA 10mM, NaCl 50mM, SDS 0.1%, protéinase K 100µg/ml pendant 30 minutes à 37°C, les membranes sont lavées abondamment dans du tampon 2 X SSC (sodium citrate NaCl), puis séchées au four sous vide à 80°C pendant 20 minutes.

c) Préhybridation et hybridation des membranes.

**[0120]** Les membranes sont alors préhybridées 2 heures à 42°C dans le tampon suivant : 1 M NaCl ; 30% formamide ; 1% SDS ; 5 X Denhart's ; 100 µg/ml d' ADN de sperme de saumon. Après les 2 heures de préhybridation, les membranes sont hybridées dans le même tampon avec une concentration de sonde IL-13Rα de souris préparée par "nick-translation" de 2.5 10<sup>6</sup> dpm/ml, pendant 16 heures ensuite. Les membranes sont lavées 2 fois 30 minutes dans le tampon 2 x SSC 0.1% SDS à température ambiante puis 2 heures à 50°C dans le même tampon. Après une nuit d'exposition à - 80°C en présence d' un film Kodak X-OMAT, plusieurs clones positifs sont révélés.

d) Séquençage d'un clone IL-13Rα humain et analyse de la séquence.

**[0121]** La séquence est obtenue à l' aide du kit Applied Biosystem (référence 401628). La séquence nucléique complète de l' ADNc de l' IL13Rα et la séquence d' acides aminés qui en est déduite sont montrées sur la figure 7. L' ADNc a une longueur de 3999 bases en excluant la queue de poly-A et possède une longue région 3' non traduite de 2145 bases.

**[0122]** Un signal canonique de polyadénylation se trouve à la place prévue. Le cadre de lecture ouvert entre les nucléotide 34 et 1851 définit un polypeptide de 427 acides aminés. La séquence code pour une protéine membranaire avec un peptide signal potentiel, et un seul domaine transmembranaire et une courte région intracytoplasmique.

**[0123]** 10 sites de glycosylation potentiels sont localisés dans la région extracellulaire. Il est important de noter que deux motifs consensus considérés comme des signatures de la famille des récepteurs de cytokines de type II sont aussi présents, le premier étant dérivé d'une structure en boucle de pont disulfure N- terminal, le second étant le motif de type WSXWS localisé à l'extrémité C-terminale de région extracellulaire.

## EXEMPLE 8

### Analyses de liaison réalisées sur des cellules COS-3 ou CHO transfectées avec l'ADNc de l'IL-13Rα humain.

**[0124]** Les cellules CHO transfectées avec l'ADNc isolé codant pour l'IL-13Rα lient spécifiquement l'IL-13 marquée.

**[0125]** L'analyse de Scatchard de la courbe de saturation montre un seul site composant avec une Kd d'une valeur de 4,5±0,4nM et une capacité de liaison maximale de 26000 récepteurs/cellule (fig. 8C et 8G).

**[0126]** Les résultats des expériences de co-expression sont montrés dans les figures 8D et 8H.

**[0127]** L'analyse des résultats de la figure 8C met en évidence que l'IL-13Rα s'exprime bien dans le clone 2036 des cellules CHO. On peut noter que l'IL-4R déplace 60 % de la liaison de l'IL-13 dans les cellules CHO cotransfectées avec l'ADNc de l'IL-4R et de l'IL-13Rα (figure 8H) mais en tenant compte d'un Kd de 7,5 nM pour l'IL-13Rα on aurait 10 fois plus de sites IL-13Rα que de sites IL-4R.

**[0128]** Les cellules CHO-hIL4R (IL-4Rα humain) exprimant l'hIL-4R transfectées avec l'ADNc codant pour l'hIL-13Rα lient spécifiquement l'IL-13 marquée.

**[0129]** L'analyse de Scatchard de la courbe de saturation montre clairement 2 sites composants, l'un de haute affinité avec une Kd d'une valeur de 23±8,9 pM et une capacité de liaison maximale de 28000 sites/cellule et, l'autre de basse affinité, avec une Kd d'une valeur de 4,2±1,4 nM et une capacité de liaison maximale de 150000 sites/cellule (fig. 8D).

**[0130]** Le deuxième site caractérisé a la même affinité que l'hIL-13Rα (IL-13Rα humain) exprimé seul et correspond aux chaînes IL-13Rα non associées car exprimées en plus grande quantité que l'hIL-4R.

**[0131]** Ces récepteurs à haute affinité reconstitués en présence des 2 chaînes hIL-13Rα et hIL-4R sont capables de reconnaître les 2 cytokines (fig. 8D et 8H).

**[0132]** Ceci est encore plus clair sur les cellules COS/pSE1 co-exprimant les 2 chaînes hIL-13Rα et hIL-4R en quantité comparable où l'IL-4 déplace toute la liaison IL-13.

**[0133]** L'affinité de l'IL-13Rα humain recombinant est comparable à celle décrite pour le récepteur IL-13Rα de souris (2-10nM) (ref 22).

**[0134]** Contrairement à la chaîne hIL-13Rβ, précédemment décrite, l'IL-13Rα humain ne constitue pas seul un site de liaison de haute affinité.

**[0135]** L'IL-13Rα et l'IL-4R interagissent donc dans la membrane cellulaire pour reconstituer un récepteur à haute



affinité.

## EXEMPLE 9

### 5 Activation de protéines STAT par l'IL-13 et l'IL-4 dans les cellules CHO co-exprimant l'hIL-13R $\alpha$ et l'hIL-4R.

[0136] Dans les cellules PBMC humaines, l'hIL-4 et l'IL-13 activent 2 tyrosine kinases de la famille des janus, Jak1 et Jak2 qui phosphorylent un facteur latent de transcription, STAT6. Ce facteur activé entre dans le noyau et se lie à des éléments spécifiques dans les promoteurs des gènes régulés par l'IL-4.

10 [0137] Nous avons choisi l'élément C $\epsilon$  du promoteur du C $\epsilon$  humain comme sonde dans un test de changement de mobilité électrophorétique (EMSA) pour démontrer l'activation par l'IL-13 d'un facteur de liaison similaire à STAT6.

[0138] Les extraits nucléaires des cellules CHO, exprimant l'IL-13R seul, l'IL-4R seul, ou les 2 chaînes ensemble, stimulées avec 100ng/ml d'IL-13 ou d'IL-4 pendant 30mn à 37°C, sont incubés avec l'élément C $\epsilon$  radiomarqué.

15 [0139] Les extraits nucléaires des cellules co-exprimant l'hIL-13R $\alpha$  et l'hIL-4R seul, forment un complexe ayant la même mobilité dans l'EMSA que les cellules soient induites avec l'IL-4 ou l'IL-13 (cf. figure 9). Par contre, avec les cellules exprimant l'une ou l'autre chaîne seule, aucun complexe n'est détecté.

[0140] Dans les cellules CHO exprimant l'hIL-13R $\alpha$  et l'hIL-4R, l'IL-13 et l'IL-4 initient donc la même cascade de signalisation.

20 [0141] Le clonage de l'IL-13R $\beta$  et de l'IL-13R $\alpha$  décrit ici permet d'améliorer la connaissance des facteurs intervenant dans les réponses spécifiquement induites par l'IL-13 par rapport aux réponses induites par l'IL-4. Il permet en outre de disposer d'un outil pour l'étude de la régulation de l'expression du récepteur dans des conditions normales et pathologiques où l'IL-13 joue un rôle clé.

25 [0142] Par ailleurs, la disponibilité de l'ADNc permet de faciliter le clonage d'autres protéines nécessaires pour la reconstitution d'un complexe récepteur IL-4/IL-13 et est également utile pour la fabrication ou la modélisation rationnelle de nouveaux médicaments capables d'être des antagonistes spécifiques des activités de l'IL-13.

## REFERENCES :

### [0143]

- 30 1. Minty, A. *et al.*, Nature, 1993, 362, 248-250.
2. McKenzie, A.N. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 1993, 90, 3735-3739.
3. Defrance, T. *et al.*, J Exp. Med., 1994, 179, 135-143.
4. Punnonen, J. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 1993, 90, 3730-3734.
- 35 5. Fior, R. *et al.*, Eur. Cytokine Network, 1994, 5, 593-600.
6. Muzio, M. R. F. *et al.*, Blood, 1994, 83, 1738-1743.
7. De Waal Malefyt, R. *et al.*, J. Immunol, 1993, 151, 6370-6381.
8. Doyle, A. *et al.*, Eur. J. Immunol., 1994, 24, 1441-1445.
9. Montaner, L.J. *et al.*, J. Exp. Med., 1993, 178, 743-747.
- 40 10. Sozzani, P. *et al.*, J. Biol. Chem., 1995, 270, 5084-5088.
11. Herbert, J.M. *et al.*, Febs Lett., 1993, 328, 268-270.
12. Derocq, J.M. *et al.*, Febs Lett. 1994, 343, 32-36.
13. Zurawski, G. *et al.*, Immunol. Today, 1994, 15, 19-26.
14. Interleukin-13 for Cytokines in Health and Disease. Eds D.G. Remick and J.S. Frie, Marcel Decker, N.Y. 1996.
- 45 15. Zurawski S.M. *et al.*, Embo Journal, 1993, 12, 2663-2670.
16. Aversa, G. *et al.*, J. Exp. Med., 1993, 178, 2213-2218.
17. Vita, N. *et al.*, Biol. Chem., 1995, 270, 3512-3517.
18. Lefoit, S. *et al.*, Febs Lett., 1995, 366, 122-126.
19. Kondo, M. *et al.*, Science, 1993, 262, 1874-1883.
- 50 20. Russell, S.M. *et al.*, Science, 1993, 262, 1880-1883.
21. Obiri, N. *et al.*, J. Biol. Chem., 1995, 270, 8797-8804.
22. Hilton, D.J. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 497-501.
23. Canard, R.E. *et al.*, immunology Today, 1996, 17, 3, 108-110.
24. Devereux, J. *et al.*, Nucleic Acids Res., 1984, 12, 387-395.
- 55 25. Chomczynski, P. *et al.*, N. Anal. Biochem., 1987, 162, 156-159.
26. Caput, D. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83, 1670-1674.
27. Minty, a. *et al.*, Eur. Cytokine Network, 1993, 4, 99-110
28. Labit Le Bouteiller, C. *et al.*, J. of Immunol. Methods, 1995, 181, 1, 29-36.

29. Seed, B. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 3365-3369.
30. Bazan, J.F. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 6934-6938.
31. Honjo, T. *et al.*, Current Opinion in Cell Biology, 1991, 1, 201-203.
32. Giri, J.G. *et al.*, Embo Journal, 1993, 14, 3654-3663.
33. Miloux, B. *et al.*, Gene, 1994, 149, 341-344.
34. Sampayrac, L. M. *et al.*, PNAS USA, 1981, 78, 7575-7578.
35. Jiang, S-W *et al.*, Nucleic Acid Res., 1995, 23, 3607-3608.
36. Köhler, I *et al.*, FEBS Letters, 1994, 345, 187-192.
37. Seidel., H.M. *et al.*, PNAS USA, 1995, 92, 3041-3045.

LISTE DE SEQUENCES

[0144]

- <110> Sanofi-Synthélabo
- <120> Polypeptide récepteur de l'IL-13
- <130> BET 96/884
- <140> PCT/FR96/01756
- <141> 1996-11-07
- <150> FR 95/14424
- <151> 1995-12-06
- <160> 4
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 1298
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

```

5  ggtgcctgtc ggcggggaga gaggcaatat caaggtttta aatctcggag aaatggcttt 60
   cgtttgcttg gctatcggat gcttatatac ctttctgata agcacaacat ttggctgtac 120
   ttcattcttca gacaccgaga taaaagttta ccttcctcag gattttgaga tagtggatcc 180
   cggataactta gggtatctct atttgcaatg gcaaccccca ctgtctctgg atcattttta 240
   ggaatgcaca gtggaatatg aactaaaata ccgaaacatt ggtagtgaaa catggaagac 300
   catcattact aagaatctac attacaaaga tgggtttgat cttaacaagg gcattgaagc 360
   gaagatacac acgcttttac catggcaatg cacaaatgga tcagaagttc aaagttcctg 420
   ggcagaaact acttattgga tatcaccaca aggaattcca gaaactaaag ttcaggatat 480
10  ggattgcgta tattacaatt ggcaatattt actctgttct tggaaacctg gcataggtgt 540
   acttcttgat accaattaca acttgtttta ctggtatgag ggcttggatc atgcattaca 600
   gtgtgttgat tacatcaagg ctgatggaca aaatatagga tgcagatttc cctatttggg 660
   ggcacagac tataaagatt tctatatattg tgtaaatgga tcatcagaga acaagcctat 720
   cagatccagt tatttcactt ttcagcttca aaatatagtt aaacctttgc cgccagtcta 780
   tcttactttt actcgggaga gttcatgtga aattaagctg aaatggagca tacctttggg 840
15  acctattcca gcaagggtgt ttgattatga aattgagatc agagaagatg atactacctt 900
   ggtgactgct acagttgaaa atgaaacata caccttgaaa acaacaaatg aaacccgaca 960
   attatgcttt gtagtaagaa gcaaagtga tatttattgc tcagatgacg gaatttggag 1020
   tgagtggagt gataaacaat gctgggaagg tgaagaccta tcgaagaaaa ctttgctacg 1080
   tttctggcta ccatttggtt tcatcttaat attagttata tttgtaaccg gtctgctttt 1140
20  gcgtaagcca aacacctacc caaaaatgat tccagaattt ttctgtgata catgaagact 1200
   ttccatatca agagacatgg tattgactca acagtttcca gtcatggcca aatgttcaat 1260
   atgagtctca ataaactgaa tttttcttgc gaatgttg 1298

```

```

25  <210> 2
     <211> 380
     <212> PRT
     <213> Homo sapiens

```

```

30  <400> 2

```

```

Met Ala Phe Val Cys Leu Ala Ile Gly Cys Leu Tyr Thr Phe Leu Ile
  1           5           10           15

```

```

35  Ser Thr Thr Phe Gly Cys Thr Ser Ser Ser Asp Thr Glu Ile Lys Val
     20           25           30

```

```

Asn Pro Pro Gln Asp Phe Glu Ile Val Asp Pro Gly Tyr Leu Gly Tyr

```

```

40

```

```

45

```

```

50

```

```

55

```

## EP 0 876 482 B1

	35	40	45
5	Leu Tyr Leu Gln Trp Gln Pro Pro Leu Ser Leu Asp His Phe Lys Glu 50 55 60		
	Cys Thr Val Glu Tyr Glu Leu Lys Tyr Arg Asn Ile Gly Ser Glu Thr 65 70 75 80		
10	Trp Lys Thr Ile Ile Thr Lys Asn Leu His Tyr Lys Asp Gly Phe Asp 85 90 95		
	Leu Asn Lys Gly Ile Glu Ala Lys Ile His Thr Leu Leu Pro Trp Gln 100 105 110		
15	Cys Thr Asn Gly Ser Glu Val Gln Ser Ser Trp Ala Glu Thr Thr Tyr 115 120 125		
	Trp Ile Ser Pro Gln Gly Ile Pro Glu Thr Lys Val Gln Asp Met Asp 130 135 140		
20	Cys Val Tyr Tyr Asn Trp Gln Tyr Leu Leu Cys Ser Trp Lys Pro Gly 145 150 155 160		
	Ile Gly Val Leu Leu Asp Thr Asn Tyr Asn Leu Phe Tyr Trp Tyr Glu 165 170 175		
25	Gly Leu Asp His Ala Leu Gln Cys Val Asp Tyr Ile Lys Ala Asp Gly 180 185 190		
	Gln Asn Ile Gly Cys Arg Phe Pro Tyr Leu Glu Ala Ser Asp Tyr Lys 195 200 205		
30	Asp Phe Tyr Ile Cys Val Asn Gly Ser Ser Glu Asn Lys Pro Ile Arg 210 215 220		
	Ser Ser Tyr Phe Thr Phe Gln Leu Gln Asn Ile Val Lys Pro Leu Pro 225 230 235 240		
35	Pro Val Tyr Leu Thr Phe Thr Arg Glu Ser Ser Cys Glu Ile Lys Leu 245 250 255		
	Lys Trp Ser Ile Pro Leu Gly Pro Ile Pro Ala Arg Cys Phe Asp Tyr 260 265 270		
40	Glu Ile Glu Ile Arg Glu Asp Asp Thr Thr Leu Val Thr Ala Thr Val 275 280 285		
	Glu Asn Glu Thr Tyr Thr Leu Lys Thr Thr Asn Glu Thr Arg Gln Leu 290 295 300		
45	Cys Phe Val Val Arg Ser Lys Val Asn Ile Tyr Cys Ser Asp Asp Gly 305 310 315 320		
	Ile Trp Ser Glu Trp Ser Asp Lys Gln Cys Trp Glu Gly Glu Asp Leu 325 330 335		
50	Ser Lys Lys Thr Leu Leu Arg Phe Trp Leu Pro Phe Gly Phe Ile Leu 340 345 350		
	Ile Leu Val Ile Phe Val Thr Gly Leu Leu Leu Arg Lys Pro Asn Thr 355 360 365		
55			

EP 0 876 482 B1

Tyr Pro Lys Met Ile Pro Glu Phe Phe Cys Asp Thr  
370 375 380

5 <210> 3  
<211> 4009  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

10 <400> 3

15

20

25

30

35

40

45

50

55

tcagcccgcc cgggctccga ggcgagaggg tgcattggagt ggccggcgcg gctctgcggg 60  
 ctgtggggcg tgctgctctg cgccggcgcc gggggcgggg gcggggggcg cgccgctacg 120  
 gaaactcagc cacctgtgac aaatttgagt gtctctgttg aaaacctctg cacagtaata 180  
 5 tggacatgga atccacccga gggagccagc tcaaattgta gtctatggta ttttagtcat 240  
 tttggcgaca aacaagataa gaaaatagct ccggaaactc gtcgttcaat agaagtaccc 300  
 ctgaatgaga ggatttgtct gcaagtgggg tcccagtgtg gcaccaatga gagtgagaag 360  
 cctagcattt tggttgaaaa atgcattctc ccccgagaag gtgatcctga gtctgctgtg 420  
 actgagcttc aatgcatttg gcacaacctg agctacatga agtgttcttg gctccctgga 480  
 10 aggaatacca gtcccgacac taactatact ctctactatt ggacacagaag cctggaaaaa 540  
 attcatcaat gtgaaaaacat ctttagagaa ggccaatact ttggttgttc ctttgatctg 600  
 accaaaagtga aggattccag ttttgaacaa cacagtgtcc aaataatggg caaggataat 660  
 gcaggaaaaa ttaaacctac cttcaatata gtgcctttaa cttcccggtg gaaacctgat 720  
 cctccacata ttaaaaaacct ctcttccac aatgatgacc tatatgtgca atgggagaa 780  
 ccacagaatt ttattagcag atgcctattt tatgaagtag aagtcaataa cagccaaact 840  
 15 gagacacata atgttttcta cgtccaagag gctaaatgtg agaatccaga atttgagaga 900  
 aatgtggaga atacatcttg tttcatggtc cctggtgttc ttcctgatac tttgaacaca 960  
 gtcagaataa gagtcaaaac aaataagtta tgctatgagg atgacaaact ctggagtaat 1020  
 tggagccaag aaatgagtat aggtaaagaag cgcaattcca cactctacat aacctgtta 1080  
 20 ctcatgttgc cagtcattct cgcaagtgga atcatagtag tcctgcttta cctaaaaagg 1140  
 ctcaagatta ttatattccc tccaattcct gatcctggca agatttttaa agaaatgttt 1200  
 ggagaccaga atgatgatac tctgcactgg aagaagtacg acatctatga gaagcaaac 1260  
 aaggaggaaa ccgactctgt agtgctgata gaaacctga agaaagcctc tcagtgatgg 1320  
 agataattta tttttacctt cactgtgacc ttgagaagat tcttccattt cctcatttgt 1380  
 tatctgggaa cttattaaat ggaaactgaa actactgcac catttaaaaa caggcagctc 1440  
 25 ataagagcca caggctctta tgttgagtcg cgcaccgaaa aactaaaaat aatgggcgct 1500  
 ttggagaaga gtgtggagtc attctcattg aattataaaa gccagcaggc ttcaaaactag 1560  
 gggacaaagc aaaaagtgat gatagtggg gagttaatct tatcaagagt tgtgacaact 1620  
 tcttgaggga tctatacttg ctttgtgttc tttgtgtcaa catgaacaaa ttttatttgt 1680  
 aggggaactc atttggggtg caaatgctaa tgtcaaaact gagtcaaaa gaacatgtag 1740  
 30 aaaacaaaat ggataaaatc tgatatgtat tgtttgggat cctattgaac catgtttgtg 1800  
 gctattaaaa ctcttttaac agtctgggct ggggtccggtg gctcacgcct gtaatcccag 1860  
 caatttggga gtccgaggcg ggcggatcac tccagggtcag gaggttccaga ccagcctgac 1920  
 caaaatggtg aaacctcctc tctactaaaa ctacaaaaat taactgggtg tgggtggcgcg 1980  
 tgccgttaat cccagctact cgggaagctg aggcagggtg attgtttgaa cctgggagggt 2040  
 35 ggaggttgca gtgagcagag atcacaccac tgcactctag cctgggtgac agagcaagac 2100  
 tctgtctaaa aaacaaaaca aaacaaaaca aaacaaaaaa acctcttaat attctggagt 2160  
 catcattccc ttccagacga ttttctcttg ctttgaaagc cccagaaatc agtgttggcc 2220  
 atgatgacaa ctacagaaaa accagaggca gcttctttgc caagacctt caaagccatt 2280  
 ttaggctgtt aggggcagtg gaggtagaat gactccttgg gtattagagt ttcaacctg 2340  
 aagtctctaa caatgtattt tcttcacctc tgctactcaa gtagcattta ctgtgtcttt 2400  
 40 ggtttgtgct agggccccgg gtgtgaagca cagaccctt ccaggggttt acagtctatt 2460  
 tgagactcct cagttcttgc cacttttttt tttaatctcc accagtcatt tttcagacct 2520  
 ttttaactcct caattccaac actgatttcc ctttttgcac tctccctcct tcccttctt 2580  
 gtagcctttt gacttttcat ggaaattagg atgtaaatct gtcaggaga cctggaggag 2640  
 cagaggataa ttagcatctc aggttaagtg tgagtaatct gagaaacaat gactaattct 2700  
 45 tgcataattt gtaacttcca tgtgagggtt ttcagcattg atatttgtgc attttctaaa 2760  
 cagagattgag gtggtatctt cacgtagaac attggtattc gcttgagaaa aaaagaatag 2820  
 ttgaacctat ttctctttct ttacaagatg ggtccaggat tctcttttct tctgccataa 2880  
 atgattaatt aaatagcttt tgtgtcttac attggtagcc agccagccaa ggtctgttt 2940  
 50 atgcttttgg ggggcatata ttgggttcca ttctcaccta tccacacaac atatccgtat 3000

EP 0 876 482 B1

.  
 atatcccctc tactcttact tcccccaaat ttaaagaagt atgggaaatg agaggcattt 3060  
 cccccacccc atttctctcc tcacacacag actcatatta ctggtaggaa cttgagaact 3120  
 ttattttccaa gttgttcaaa cattttaccaa tcatattaat acaatgatgc tatttgcaat 3180  
 5 tctgtctcct aggggagggg agataagaaa ccctcactct ctacagggtt ggttacaagt 3240  
 ggcaacctgc ttccatggcc gtgtagaagc atgggtgccct ggcttctctg aggaagctgg 3300  
 ggttcatgac aatggcagat gtaaagttat tcttgaagtc agattgaggc tgggagacag 3360  
 ccgtagtaga tgttctactt tggtctgctg ttctctagaa agaataattg gttttcctgt 3420  
 ataggaatga gattaattcc tttccaggta ttttataatt ctgggaagca aaacccatgc 3480  
 10 ctccccctag ccatttttac tggtatccta tttagatggc catgaagagg atgctgtgaa 3540  
 attcccaaca aacattgatg ctgacagtca tgcagtctgg gagtggggaa gtgatctttt 3600  
 gttcccatcc tcttctttta gcagtaaaat agctgaggga aaagggaggg aaaaggaagt 3660  
 tatgggaata cctgtggtgg ttgtgatccc taggtcttgg gagctcttgg aggtgtctgt 3720  
 atcagtggat ttcccatccc ctgtgggaaa ttagtaggct catttactgt tttagggtcta 3780  
 gcctatgtgg attttttcct aacataccta agcaaaccce gtgtcaggat ggtaattctt 3840  
 15 attctttcgt tcagttaagt ttttccttc atctgggcac tgaagggata tgtgaaacaa 3900  
 tgtaacatt tttggtagtc ttcaaccagg gattgtttct gtttaacttc ttataggaaa 3960  
 gcttgagtaa aataaatatt gtctttttgt atgtcaccca aaaaaaaaaa 4009

20 <210> 4  
 <211> 427  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25 <400> 4

30

35

40

45

50

55

Met Glu Trp Pro Ala Arg Leu Cys Gly Leu Trp Ala Leu Leu Leu Cys  
 1 5 10 15  
 5 Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Pro Thr Glu Thr Gln  
 20 25 30  
 Pro Pro Val Thr Asn Leu Ser Val Ser Val Glu Asn Leu Cys Thr Val  
 35 40 45  
 10 Ile Trp Thr Trp Asn Pro Pro Glu Gly Ala Ser Ser Asn Cys Ser Leu  
 50 55 60  
 Trp Tyr Phe Ser His Phe Gly Asp Lys Gln Asp Lys Lys Ile Ala Pro  
 65 70 75 80  
 15 Glu Thr Arg Arg Ser Ile Glu Val Pro Leu Asn Glu Arg Ile Cys Leu  
 85 90 95  
 Gln Val Gly Ser Gln Cys Ser Thr Asn Glu Ser Glu Lys Pro Ser Ile  
 100 105 110  
 20 Leu Val Glu Lys Cys Ile Ser Pro Pro Glu Gly Asp Pro Glu Ser Ala  
 115 120 125  
 Val Thr Glu Leu Gln Cys Ile Trp His Asn Leu Ser Tyr Met Lys Cys  
 130 135 140  
 25 Ser Trp Leu Pro Gly Arg Asn Thr Ser Pro Asp Thr Asn Tyr Thr Leu  
 145 150 155 160  
 30 Tyr Tyr Trp His Arg Ser Leu Glu Lys Ile His Gln Cys Glu Asn Ile  
 165 170 175  
 Phe Arg Glu Gly Gln Tyr Phe Gly Cys Ser Phe Asp Leu Thr Lys Val  
 180 185 190  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55



Lys Asp Ser Ser Phe Glu Gln His Ser Val Gln Ile Met Val Lys Asp  
 195 200 205  
 5 Asn Ala Gly Lys Ile Lys Pro Ser Phe Asn Ile Val Pro Leu Thr Ser  
 210 215 220  
 Arg Val Lys Pro Asp Pro Pro His Ile Lys Asn Leu Ser Phe His Asn  
 225 230 235 240  
 10 Asp Asp Leu Tyr Val Gln Trp Glu Asn Pro Gln Asn Phe Ile Ser Arg  
 245 250 255  
 Cys Leu Phe Tyr Glu Val Glu Val Asn Asn Ser Gln Thr Glu Thr His  
 15 260 265 270  
 Asn Val Phe Tyr Val Gln Glu Ala Lys Cys Glu Asn Pro Glu Phe Glu  
 275 280 285  
 20 Arg Asn Val Glu Asn Thr Ser Cys Phe Met Val Pro Gly Val Leu Pro  
 290 295 300  
 Asp Thr Leu Asn Thr Val Arg Ile Arg Val Lys Thr Asn Lys Leu Cys  
 305 310 315 320  
 25 Tyr Glu Asp Asp Lys Leu Trp Ser Asn Trp Ser Gln Glu Met Ser Ile  
 325 330 335  
 Gly Lys Lys Arg Asn Ser Thr Leu Tyr Ile Thr Met Leu Leu Ile Val  
 30 340 345 350  
 Pro Val Ile Val Ala Gly Ala Ile Ile Val Leu Leu Leu Tyr Leu Lys  
 355 360 365  
 35 Arg Leu Lys Ile Ile Ile Phe Pro Pro Ile Pro Asp Pro Gly Lys Ile  
 370 375 380  
 Phe Lys Glu Met Phe Gly Asp Gln Asn Asp Asp Thr Leu His Trp Lys  
 385 390 395 400  
 40 Lys Tyr Asp Ile Tyr Glu Lys Gln Thr Lys Glu Glu Thr Asp Ser Val  
 405 410 415  
 Val Leu Ile Glu Asn Leu Lys Lys Ala Ser Gln  
 420 425  
 45

# 50 Revendications

1. Polypeptide purifié, comprenant une séquence d'acides aminés choisie parmi :

- 55 a) la séquence SEQ ID n° 2,  
 b) toute séquence dérivée de SEQ ID n° 2 et capable de se lier spécifiquement à l'IL-13 et/ou de participer à la transduction du signal spécifiquement produit par l'IL-13 au niveau de la membrane cellulaire, et/ou capable d'interagir avec le récepteur spécifique de l'IL-4 (IL-4R/gp 140) pour former un complexe capable de lier l'IL-4 et l'IL-13.

2. Polypeptide selon la revendication 1, **caractérisé en ce qu'il** comprend la séquence d'acides aminés SEQ ID n° 2.
3. Polypeptide selon la revendication 1, **caractérisé en ce qu'il** s'agit d'une forme variante du polypeptide de séquence SEQ ID n°2 dans laquelle les 8 résidus C-terminaux sont substitués par les 6 résidus suivants : VRCVTL.
4. Polypeptide selon la revendication 1, **caractérisé en ce qu'il** s'agit d'une forme soluble s'étendant jusqu'au résidu 343.
5. Polypeptide selon la revendication 1, **caractérisé en ce qu'il** s'agit d'une forme soluble s'étendant jusqu'au résidu 337.
6. Séquence d'acides nucléiques isolée codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.
7. Séquence d'acides nucléiques isolée selon la revendication 6, **caractérisée en ce qu'elle** est choisie parmi :
  - a) la séquence SEQ ID n° 1,
  - b) les séquences d'acides nucléiques capables de s'hybrider à la séquence SEQ ID n° 1 et codant pour un polypeptide ayant une activité de récepteur  $\beta$  de l'IL-13,
  - c) les séquences d'acides nucléiques dérivées des séquences a) et b) du fait de la dégénérescence du code génétique.
8. Séquence d'acides nucléiques selon la revendication 7, **caractérisée en ce qu'elle** comprend ou est constituée par l'enchaînement de nucléotides s'étendant du nucléotide n° 1 jusqu'au nucléotide 1081, et préférentiellement jusqu'au nucléotide 1063 sur la séquence SEQ ID n° 1.
9. Polypeptide purifié, comprenant une séquence d'acides aminés choisie parmi :
  - a) la séquence SEQ ID n° 4,
  - b) toute séquence dérivée de SEQ ID n°4 et capable de se lier spécifiquement à IL A3 et/ou de participer à la transduction du signal spécifiquement produit par l'IL-13 au niveau de la membrane cellulaire, et/ou capable d'interagir avec le récepteur spécifique de l'IL-4 (IL-4R/gp 140) pour former un complexe capable de lier l'IL-4 et l'IL-13.
10. Polypeptide selon la revendication 9, **caractérisé en ce qu'il** comprend la séquence d'acides aminés SEQ ID n° 4.
11. Polypeptide selon la revendication 10, **caractérisé en ce qu'il** s'agit d'une forme soluble s'étendant jusqu'au résidu 343 et préférentiellement jusqu'aux résidus compris entre 336 et 342.
12. Séquence d'acides nucléiques isolée codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 9 à 11.
13. Séquence d'acides nucléiques isolée selon la revendication 12, **caractérisée en ce qu'elle** est choisie parmi :
  - a) la séquence SEQ ID n° 3,
  - b) les séquences d'acides nucléiques capables de s'hybrider à la séquence SEQ ID n° 3 et codant pour un polypeptide ayant une activité de récepteur  $\alpha$  de l'IL-13,
  - c) les séquences d'acides nucléiques dérivées des séquences a) et b) du fait de la dégénérescence du code génétique.
14. Séquence d'acides nucléiques selon la revendication 13, **caractérisé en ce qu'elle** comprend ou est constituée par l'enchaînement de nucléotides s'étendant du nucléotide n° 1 jusqu'au nucléotide 1059, et préférentiellement jusqu'aux nucléotides compris entre 1041 et 1056 sur la séquence SEQ ID n° 3.
15. Vecteur de clonage et/ou d'expression contenant une séquence d'acides nucléiques selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 et 12 à 14.
16. Vecteur selon la revendication 15, **caractérisé en ce qu'il** s'agit du plasmide PSE-1.
17. Cellule hôte transfectée par un vecteur selon la revendication 15 ou 16.

18. Cellule hôte transfectée selon la revendication 17, **caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de la lignée COS-7, COS-3 ou CHO.**

19. Sonde nucléotidique hybridant spécifiquement avec l'une quelconque des séquences selon les revendications 6 à 8, leurs séquences complémentaires ou les ARN messagers correspondants, **caractérisée en ce qu'elle comprend l'intégralité de la séquence SEQ ID n° 1 ou de son brin complémentaire.**

20. Sonde nucléotidique hybridant spécifiquement avec l'une quelconque des séquences selon les revendications 12 à 14, leurs séquences complémentaires ou les ARN messagers correspondants, **caractérisée en ce qu'elle comprend l'intégralité de la SEQ ID n° 3 ou de son brin complémentaire.**

21. Utilisation d'une sonde comportant au moins 10 nucléotides hybridant spécifiquement dans des conditions de forte stringence avec l'une quelconque des séquences selon les revendications 6 à 8, leurs séquences complémentaires ou les ARN messagers correspondants, pour la détection *in vitro* de transcrits spécifiques des polypeptides selon les revendications 1 à 5.

22. Utilisation d'une sonde comportant au moins 10 nucléotides hybridant spécifiquement dans des conditions de forte stringence avec l'une quelconque des séquences selon les revendications 12 à 14, leurs séquences complémentaires ou les ARN messagers correspondants, pour la détection *in vitro* de transcrits spécifiques des polypeptides selon les revendications 9 à 11.

23. Séquence antisens capable d'inhiber, au moins partiellement, la production de polypeptides selon l'une quelconque des revendications 5 et 9 à 11, **caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les séquences constituant le cadre de lecture codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 et 9 à 11 au niveau du transcript.**

24. Utilisation d'une séquence selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 et 12 à 14, pour la réalisation de sondes nucléotidiques de diagnostic ou de séquences antisens utilisables en thérapie génique.

25. Utilisation d'une sonde telle que décrite dans l'une quelconque des revendications 19 à 22, comme outil de diagnostic *in vitro* pour la détection, par hybridation, des séquences d'acides nucléiques codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 9 à 11, dans des échantillons biologiques, ou pour la mise en évidence de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques telles que la perte d'hétérozygotie ou le réarrangement génétique.

26. Utilisation d'une sonde telle que décrite dans l'une quelconque des revendications 19 à 22, pour la détection d'anomalies chromosomiques.

27. Méthode de diagnostic *in vitro* pour la détection de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques au niveau des séquences d'acides nucléiques codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 9 à 11, **caractérisée en ce qu'elle comprend :**

- la mise en contact d'une sonde nucléotidique telle que décrite dans l'une quelconque des revendications 19 à 22 avec un échantillon biologique dans des conditions permettant la formation d'un complexe d'hybridation entre ladite sonde et la susdite séquence nucléotidique, éventuellement après une étape préalable d'amplification de la susdite séquence nucléotidique ;
- la détection du complexe d'hybridation éventuellement formé ;
- éventuellement le séquençage de la séquence nucléotidique formant le complexe d'hybridation avec la sonde de l'invention.

28. Utilisation d'une séquence d'acides nucléiques selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 et 12 à 14, pour la production d'un polypeptide recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 et 9 à 11.

29. Méthode de production d'un polypeptide recombinant récepteur de l'IL-13, **caractérisée en ce que l'on cultive des cellules transfectées selon la revendication 17 ou 18 dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide recombinant de séquence SEQ ID n° 2 ou de séquence SEQ ID n° 4 dérivée, et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.**

30. Anticorps mono ou polyclonaux, anticorps conjugués, ou leur fragments, **caractérisés en ce qu'ils** sont capables de reconnaître spécifiquement un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 et 9 à 11.

31. Utilisation des anticorps selon la revendication précédente, pour la purification ou la détection d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 et 9 à 11 dans un échantillon biologique.

32. Procédé de diagnostic *in vitro* de pathologies corrélées à une expression anormale du récepteur de l'IL-13, à partir de prélèvements biologiques susceptibles de contenir le récepteur de l'IL-13 exprimé à un taux anormal, **caractérisé en ce que** l'on met en contact au moins un anticorps selon la revendication 30 avec ledit prélèvement biologique, dans des conditions permettant la formation éventuelle de complexes immunologiques spécifiques entre le récepteur de l'IL-13 et le ou lesdits anticorps et **en ce que** l'on détecte les complexes immunologiques spécifiques éventuellement formés.

33. Kit pour le diagnostic *in vitro* d'une expression anormale du récepteur de l'IL-13 dans un prélèvement biologique et/ou pour la mesure du taux d'expression du récepteur de l'IL-13 dans ledit prélèvement comprenant :

- au moins un anticorps spécifique du récepteur de l'IL-13 selon la revendication 30, éventuellement fixé sur un support,
- des moyens de révélation de la formation de complexes antigènes/anticorps spécifiques entre le récepteur de l'IL-13 et ledit anticorps et/ou des moyens de quantification de ces complexes.

34. Méthode pour l'identification et/ou l'isolement de polypeptides selon la revendication 1 ou 9, ou d'agents capables de moduler leur activité, **caractérisée en ce que** l'on met en contact un composé ou un mélange contenant différents composés, éventuellement non-identifiés, avec des cellules exprimant à leur surface un polypeptide selon la revendication 1 ou 9, dans des conditions permettant l'interaction entre le polypeptide et ledit composé dans le cas où celui-ci posséderait une affinité pour le polypeptide, et **en ce que** l'on détecte et/ou isole les composés liés au polypeptide ou ceux capables d'en moduler l'activité biologique.

35. Composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 9 à 11.

36. Composition pharmaceutique selon la revendication précédente, **caractérisée en ce qu'elle** comprend un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 4, 5 ou 10.

37. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour le criblage d'agents capables de moduler l'activité de l'IL-13R $\beta$ .

38. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, pour le criblage d'agents capables de moduler l'activité de l'IL-13R $\alpha$ .

39. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour la fabrication de produits capables de moduler l'activité de l'IL-13R $\beta$ .

40. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, pour la fabrication de produits capables de moduler l'activité de l'IL-13R $\alpha$ .

41. Utilisation d'un polypeptide selon la revendication 4, 5 ou 10 pour la synthèse d'un médicament destiné au traitement des conditions sensible à un effet antagoniste de l'IL-13 antagoniste de l'IL-13.

42. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 9 à 11 pour la préparation d'une composition pharmaceutique utile pour la régularisation des mécanismes immunologiques et inflammatoires produits par l'IL-13.

## Patentansprüche

1. Gereinigtes Polypeptid umfassend eine Aminosäuresequenz ausgewählt aus:

- a) der Sequenz SEQ ID Nr. 2,  
b) jede von SEQ ID Nr. 2 abgeleitete Sequenz, die dazu in der Lage ist, sich spezifisch an IL-13 zu binden und/oder an der Transduktion des durch IL-13 spezifisch gebildeten Signals im Bereich der Zellmembran teilzunehmen und/oder mit dem spezifischen Rezeptor von IL-4 (IL-4R/gp 140) in Wechselwirkung zu treten zur Bildung eines Komplexes, der dazu in der Lage ist, IL-4 und IL-13 zu binden.
2. Polypeptid nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, daß** es die Aminosäuresequenz SEQ ID Nr. 2 enthält.
3. Polypeptid nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, daß** es sich um eine Variante des Polypeptids der Sequenz SEQ ID Nr. 2 handelt, bei der die 8 C-terminalen Reste durch die folgenden 6 Reste substituiert sind: VRCVTL.
4. Polypeptid nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, daß** es sich um eine lösliche Form handelt, die sich bis zu dem Rest 343 erstreckt.
5. Polypeptid nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, daß** es sich um eine lösliche form handelt, die sich bis zu dem Rest 337 erstreckt.
6. Isolierte Nucleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 5 codiert.
7. Isolierte Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet, daß** sie ausgewählt ist aus:
  - a) der Sequenz SEQ ID Nr. 1.
  - b) Nucleinsäuresequenzen, die dazu in der Lage sind, mit der Sequenz SEQ ID Nr. 1 zu hybridisieren und die für ein Polypeptid codieren, das eine  $\beta$ -Rezeptor-Aktivität für IL-13 aufweist,
  - c) die von den Sequenzen a) und b) als Folge der Degenerierung des genetischen Codes abgeleiteten Nucleinsäuresequenzen.
8. Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet, daß** sie umfaßt oder gebildet ist durch die Nucleotidkette, die sich vom Nucleotid Nr. 1 bis zu dem Nucleotid 1081 und vorzugsweise bis zu dem Nucleotid 1063 der Sequenz SEQ ID Nr. 1 erstreckt.
9. Gereinigtes Polypeptid umfassend eine Aminosäuresequenz ausgewählt aus:
  - a) der Sequenz SEQ ID Nr. 4,
  - b) jede von SEQ ID Nr. 4 abgeleitete Sequenz, die dazu in der Lage ist, sich spezifisch an IL-13 zu binden und/oder an der Transduktion des von IL-13 spezifisch erzeugten Signals im Bereich der Zellmembran teilzunehmen und/oder mit dem spezifischen Rezeptor für IL-4 (IL-4R/gp 140) in Wechselwirkung zu treten unter Bildung eines Komplexes, der dazu in der Lage ist, IL-4 und IL-13 zu binden.
10. Polypeptid nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet, daß** es die Aminosäuresequenz SEQ ID Nr. 4 umfaßt.
11. Polypeptid nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet, daß** es sich um eine lösliche Form handelt, die sich bis zu dem Rest 343 und vorzugsweise bis zu den Resten zwischen 336 und 342 erstreckt.
12. Isolierte Nucleinsäuresequenz codierend für ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 9 bis 11.
13. Isolierte Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet, daß** sie ausgewählt ist aus:
  - a) der Sequenz SEQ ID Nr. 3,
  - b) Nucleinsäuresequenzen, die in der Lage sind, mit der Sequenz SEQ ID Nr. 3 zu hybridisieren und für ein Polypeptid mit einer  $\alpha$ -Rezeptor-Aktivität für IL-13 zu codieren,
  - c) von den Sequenzen a) und b) als Folge der Degenerierung des genetischen Codes abgeleitete Nucleinsäuresequenzen.
14. Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet, daß** sie umfaßt oder gebildet ist durch eine Nucleotidkette, die sich von dem Nucleotid Nr. 1 bis zu dem Nucleotid 1059 und vorzugsweise bis zu Nucleotiden zwischen 1041 und 1056 der Sequenz SEQ ID Nr. 3 erstrecken.

15. Klonierungs- und/oder Expressionsvektor enthaltend eine Nucleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 6 bis 8 und 12 bis 14.

16. Vektor nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet, daß** es sich um das Plasmid PSE-1 handelt.

17. Wirtszelle, die mit einem Vektor nach Anspruch 15 oder 16 transfiziert ist.

18. Transfizierte Wirtszelle nach Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet, daß** es sich um eine Zelle der Linie COS-7, COS-3 oder CHO handelt.

19. Nucleotidsonde, die spezifisch hybridisiert mit irgendeiner der Sequenzen nach den Ansprüchen 6 bis 8, deren komplementären Sequenzen oder entsprechenden Messenger-RNA, **dadurch gekennzeichnet, daß** sie die vollständige Sequenz SEQ ID Nr. 1 oder ihren komplementären Strang umfaßt.

20. Nucleotidsonde, die spezifisch hybridisiert mit irgendeiner der Sequenzen nach den Ansprüchen 12 bis 14, deren komplementären Sequenzen oder entsprechenden Messenger-RNA, **dadurch gekennzeichnet, daß** sie die vollständige Sequenz SEQ ID Nr. 3 oder ihren komplementären Strang umfaßt.

21. Verwendung einer Sonde, die mindestens 10 Nucleotide aufweist, die spezifisch unter den Bedingungen der starken Stringenz mit irgendeiner der Sequenzen nach den Ansprüchen 6 bis 8, deren komplementären Sequenzen oder entsprechenden Messenger-RNA hybridisiert, zum *in vitro*-Nachweis von spezifischen Transkripten von Polypeptiden nach den Ansprüchen 1 bis 5.

22. Verwendung einer Sonde, die mindestens 10 Nucleotide enthält, die spezifisch unter den Bedingungen der starken Stringenz mit irgendeiner der Sequenzen nach den Ansprüchen 12 bis 14, deren komplementären Sequenzen oder entsprechenden Messenger-RNA hybridisiert zum *in vitro*-Nachweis von spezifischen Transkripten von Polypeptiden nach den Ansprüchen 9 bis 11.

23. Antisens-Sequenz, die dazu in der Lage ist, mindestens teilweise die Bildung von Polypeptiden nach einem der Ansprüche 5 bis 9 und 11 zu inhibieren, **dadurch gekennzeichnet, daß** sie aus Sequenzen ausgewählt ist, welche den Leserahmen bilden, der für ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 5 und 9 bis 11 im Bereich der Transkription codiert.

24. Verwendung einer Sequenz nach einem der Ansprüche 6 bis 8 und 12 bis 14 für die Erzeugung von diagnostischen Nucleotidsonden oder von Antisens-Sequenzen, die in der Gentherapie eingesetzt werden können.

25. Verwendung einer Sonde nach irgendeinem der Ansprüche 19 bis 22 als diagnostisches Werkzeug *in vitro* für den Nachweis durch Hybridisierung von Nucleinsäuresequenzen, die für ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder 9 bis 11 codieren, in biologischen Proben oder für den Nachweis von Fehlsynthesen oder genetischen Anomalien, wie den Verlust der Heterozygotie oder der genetischen Umlagerung.

26. Verwendung einer Sonde, wie sie in irgendeinem der Ansprüche 19 bis 22 beschrieben ist, für den Nachweis von Chromosomen-Anomalien.

27. *in vitro*-Diagnosemethode zum Nachweis von Fehlsynthesen oder genetischen Anomalien im Bereich von Nucleinsäuresequenzen, die für ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder 9 bis 11 codieren, **dadurch gekennzeichnet, daß** sie umfaßt:

- Inkontaktbringen einer Nucleotidsonde, wie sie in irgendeinem der Ansprüche 19 bis 22 beschrieben ist, mit einer biologischen Probe unter Bedingungen, welche die Bildung eines Hybridisierungskomplexes zwischen der Sonde und der genannten Nucleotidsequenz ermöglichen, gegebenenfalls nach einer vorausgehenden Stufe der Vermehrung der Nucleotidsequenz;
- Nachweis des gegebenenfalls gebildeten Hybridisierungskomplexes;
- gegebenenfalls Sequenzierung der Nucleotidsequenz, welche den Hybridisierungskomplex bildet mit der erfindungsgemäßen Sonde.

28. Verwendung einer Nucleinsäuresequenz nach irgendeinem der Ansprüche 6 bis 8 und 12 bis 14 für die Herstellung eines rekombinanten Polypeptids nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5 und 9 bis 11.

29. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Rezeptor-Polypeptids für IL-13, **dadurch gekennzeichnet, daß** man nach Anspruch 17 oder 18 transfizierte Zellen unter Bedingungen züchtet, welche die Expression eines rekombinanten Polypeptids der Sequenz ID Nr. 2 oder der davon abgeleiteten Sequenz SEQ ID Nr. 4 ermöglicht, und Gewinnen des genannten rekombinanten Polypeptids.

30. Mono- oder polyclonale Antikörper, konjugierte Antikörper oder deren Fragmente, **dadurch gekennzeichnet, daß** sie dazu in der Lage sind, spezifisch ein Polypeptid nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5 und 9 bis 11 zu erkennen.

31. Verwendung der Antikörper nach dem vorhergehenden Anspruch für die Reinigung oder den Nachweis eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 5 und 9 bis 11 in einer biologischen Probe.

32. *in vitro*-Verfahren zur Diagnose von pathologischen Zuständen, die mit einer anormalen Expression des IL-13-Rezeptors verknüpft sind, ausgehend von entnommenen biologischen Proben, welche den in einem anormalen Ausmaß exprimierten IL-13-Rezeptor enthalten können, **dadurch gekennzeichnet, daß** man mindestens einen Antikörper nach Anspruch 30 mit der entnommenen biologischen Probe unter Bedingungen in Kontakt bringt, welche die eventuelle Bildung von spezifischen immunologischen Komplexen zwischen dem IL-13-Rezeptor und dem oder den Antikörpern ermöglichen, und man die gegebenenfalls gebildeten spezifischen immunologischen Komplexe nachweist.

33. Kit für die *in vitro*-Diagnose einer anormalen Expression des IL-13-Rezeptors in einer entnommenen biologischen Probe und/oder für die Bestimmung des Ausmaßes der Expression des IL-13-Rezeptors in der entnommenen Probe, umfassend:

- mindestens einen spezifischen Antikörper für den IL-13-Rezeptor nach Anspruch 30, der gegebenenfalls an einen Träger gebunden ist,
- Mittel zum Nachweis der Bildung von spezifischen Antigen/Antikörper-Komplexen zwischen dem IL-13-Rezeptor und den Antikörpern und/oder Mittel zur quantitativen Bestimmung dieser Komplexe.

34. Verfahren zur Identifizierung und/oder Isolierung der Polypeptide nach Anspruch 1 oder 9 oder von Mitteln zur Modulierung ihrer Aktivität, **dadurch gekennzeichnet, daß** man eine Verbindung oder eine Mischung, die verschiedene, gegebenenfalls nicht identifizierte Verbindungen enthält, mit Zellen, die an ihrer Oberfläche ein Polypeptid nach Anspruch 1 oder 9 exprimieren, unter Bedingungen in Kontakt bringt, welche eine Wechselwirkung zwischen dem Polypeptid und der Verbindung in dem Fall, da diese eine Affinität für das Polypeptid aufweist, ermöglichen und man die an das Polypeptid gebundenen Verbindungen oder welche dazu in der Lage sind, deren biologische Aktivität zu modulieren, nachweist und/oder isoliert.

35. Pharmazeutische Zubereitung umfassend als Wirkstoff ein Polypeptid nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5 oder 9 bis 11.

36. Pharmazeutische Zubereitung nach dem vorhergehenden Anspruch, **dadurch gekennzeichnet, daß** sie ein Polypeptid nach irgendeinem der Ansprüche 4, 5 oder 10 umfaßt.

37. Verwendung eines Polypeptids nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5 für die Trennung von Mitteln, welche die Aktivität von IL-13R $\beta$  zu modulieren in der Lage sind.

38. Verwendung eines Polypeptids nach irgendeinem der Ansprüche 9 bis 11 zur Trennung von Mitteln, die zur Modulierung der Aktivität von IL-13R $\alpha$  in der Lage sind.

39. Verwendung eines Polypeptids nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5 für die Herstellung von Produkten, die für die Modulierung der Aktivität von IL-13R $\beta$  geeignet sind.

40. Verwendung eines Polypeptids nach irgendeinem der Ansprüche 9 bis 11 für die Herstellung von Produkten, die für die Modulierung der Aktivität von IL-13R $\alpha$  geeignet sind.

41. Verwendung eines Polypeptids nach Anspruch 4, 5 oder 10 für die Synthese eines Arzneimittels zur Behandlung von Zuständen, die gegenüber einem antagonistischen Effekt von IL-13 empfindlich sind.

42. Verwendung eines Polypeptids nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5 oder 9 bis 11 für die Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur Regulierung der immunologischen und inflammatorischen Mechanismen, die von IL-13 verursacht worden sind.

5

# Claims

1. Purified polypeptide comprising an amino acid sequence selected from among:

- 10 (a) the sequence SEQ ID No. 2,  
(b) any sequence derived from SEQ ID No. 2 and capable of binding specifically to IL-13 and/or of participating in the transduction of the signal specifically produced by IL-13 at the cell membrane, and/or capable of interacting with the specific receptor for IL-4 (IL-4R/gp 140) to form a complex capable of binding IL-4 and IL-13.

- 15 2. Polypeptide according to claim 1, **characterised in that** it comprises the amino acid sequence SEQ ID No. 2.

3. Polypeptide according to claim 1, **characterised in that** it is a variant form of the polypeptide of sequence SEQ ID No. 2 wherein the 8 C-terminal residues are substituted by the following 6 residues: VRCVTL.

- 20 4. Polypeptide according to claim 1, **characterised in that** it is a soluble form extending up to residue 343.

5. Polypeptide according to claim 1, **characterised in that** it is a soluble form extending up to residue 337.

6. Isolated nucleic acid sequence coding for a polypeptide according to any one of claims 1 to 5.

25

7. Isolated nucleic acid sequence according to claim 6, **characterised in that** it is selected from among

- 30 (a) the sequence SEQ ID No. 1,  
(b) the nucleic acid sequences capable of hybridising with the sequence SEQ ID No. 1 and coding for a polypeptide having an IL-13  $\beta$ -receptor activity,  
(c) the nucleic acid sequences derived from sequences a) and b) as a result of the breakdown of the genetic code.

- 35 8. Nucleic acid sequence according to claim 7, **characterised in that** it comprises or consists of a series of nucleotides extending from nucleotide no. 1 to nucleotide 1081, and preferably to nucleotide 1063 on the sequence SEQ ID No. 1.

9. Purified polypeptide, comprising an amino acid sequence selected from among:

- 40 a) the sequence SEQ ID No. 4,  
b) any sequence derived from SEQ ID No. 4 and capable of binding specifically to IL-13 and/or of participating in the transduction of the signal specifically produced by IL-13 at the cell membrane, and/or capable of interacting with the receptor specific for IL-4 (IL-4R/gp 140) to form a complex capable of binding IL-4 and IL-13.

- 45 10. Polypeptide according to claim 9, **characterised in that** it comprises the amino acid sequence SEQ ID No. 4.

11. Polypeptide according to claim 10, **characterised in that** it is a soluble form extending up to residue 343 and preferably up to the residues between 336 and 342.

- 50 12. Isolated nucleic acid sequence coding for a polypeptide according to any one of claims 9 to 11.

13. Isolated nucleic acid sequence according to claim 12, **characterised in that** it is selected from among:

- 55 (a) the sequence SEQ ID No. 3,  
(b) the nucleic acid sequences capable of hybridising with the sequence SEQ ID No. 3 and coding for a polypeptide having an IL-13  $\alpha$ -receptor activity,  
(c) the nucleic acid sequences derived from sequences a) and b) as a result of the breakdown of the genetic code.



14. Nucleic acid sequence according to claim 13, **characterised in that** it comprises or consists of a series of nucleotides extending from nucleotide no. 1 to nucleotide 1059, and preferably to the nucleotides between 1041 and 1056 on the sequence SEQ ID No. 3.
- 5 15. Cloning and/or expression vector containing a sequence of nucleic acids according to any one of claims 6 to 8 and 12 to 14.
16. Vector according to claim 15, **characterised in that** it is the plasmid PSE-1.
- 10 17. Host cell transfected by a vector according to claim 15 or 16.
18. Transfected host cell according to claim 17, **characterised in that** it is a cell of the line COS-7, COS-3 or CHO.
- 15 19. Nucleotide probe hybridising specifically with any one of the sequences according to claims 6 to 8, the complementary sequences thereof or the corresponding messenger RNAs, **characterised in that** it includes the entire sequence SEQ ID No. 1 or the complementary strand thereof.
- 20 20. Nucleotide probe hybridising specifically with any one of the sequences according to claims 12 to 14, the complementary sequences thereof or the corresponding messenger RNAs, **characterised in that** it includes the entire sequence SEQ ID No. 3 or the complementary strand thereof.
- 25 21. Use of a probe comprising at least 10 nucleotides hybridising specifically under highly stringent conditions with any one of the sequences according to claims 6 to 8, the complementary sequences thereof or the corresponding messenger RNAs, for *in vitro* detection of specific transcripts of the polypeptides according to claims 1 to 5.
22. Use of a probe comprising at least 10 nucleotides hybridising specifically under highly stringent conditions with any one of the sequences according to claims 12 to 14, the complementary sequences thereof or the corresponding messenger RNAs, for *in vitro* detection of specific transcripts of the polypeptides according to claims 9 to 11.
- 30 23. Antisense sequence capable of at least partially inhibiting the production of polypeptides according to any one of claims 5 and 9 to 11, **characterised in that** it is selected from among the sequences that constitute the reading frame coding for a polypeptide according to any one of claims 1 to 5 and 9 to 11 at the transcription level.
- 35 24. Use of a sequence according to any one of claims 6 to 8 and 12 to 14, for producing diagnostic nucleotide probes or antisense sequences which can be used in gene therapy.
- 40 25. Use of a probe as described in any one of claims 19 to 22, as an *in vitro* diagnostic tool for detecting, by hybridisation, nucleic acid sequences coding for a polypeptide according to any one of claims 1 to 5 or 9 to 11, in biological samples, or for detecting aberrant syntheses or genetic abnormalities such as loss of heterozygosity or genetic rearrangement.
- 45 26. Use of a probe as described in any one of claims 19 to 22, for detecting chromosomal abnormalities.
27. Method of *in vitro* diagnosis for detecting aberrant syntheses or genetic abnormalities in the nucleic acid sequences coding for a polypeptide according to any one of claims 1 to 5 or 9 to 11, **characterised in that** it comprises:
  - bringing a nucleotide probe as described in any one of claims 19 to 22 into contact with a biological sample under conditions which allow the formation of a hybridisation complex between said probe and said nucleotide sequence, optionally after a prior step of amplifying said nucleotide sequence;
  - 50 - detecting the hybridisation complex which may be formed;
  - optionally sequencing the nucleotide sequence forming the hybridisation complex with the probe according to the invention.
- 55 28. Use of a nucleic acid sequence according to any one of claims 6 to 8 and 12 to 14, for producing a recombinant polypeptide according to any one of claims 1 to 5 and 9 to 11.
29. Method of producing a recombinant IL-13 receptor polypeptide, **characterised in that** transfected cells according to claim 17 or 18 are cultivated under conditions which allow the expression of a recombinant polypeptide of

sequence SEQ ID No. 2 or the derived sequence SEQ ID No. 4, and said recombinant polypeptide is recovered.

30. Monoclonal or polyclonal antibodies, conjugated antibodies or fragments thereof, **characterised in that** they are capable of specifically recognising a polypeptide according to any one of claims 1 to 5 and 9 to 11.

31. Use of the antibodies according to the preceding claim, for purifying or detecting a polypeptide according to any one of claims 1 to 5 and 9 to 11 in a biological sample.

32. Process for *in vitro* diagnosis of pathological conditions related to abnormal expression of the IL-13 receptor, from biological samples likely to contain the IL-13 receptor expressed at an abnormal level, **characterised in that** at least one antibody according to claim 30 is brought into contact with said biological sample, under conditions which allow the eventual formation of specific immunological complexes between the IL-13 receptor and the antibody or antibodies and **in that** the specific immunological complexes which may be formed are detected.

33. Kit for *in vitro* diagnosis of abnormal expression of the IL-13 receptor in a biological sample and/or for measuring the level of expression of the IL-13 receptor in said sample, comprising:

- at least one antibody specific for the IL-13 receptor according to claim 30, optionally fixed to a carrier,
- means for revealing the formation of specific antigen/antibody complexes between the IL-13 receptor and said antibody and/or means for quantifying these complexes.

34. Method of identifying and/or isolating polypeptides according to claim 1 or 9, or agents capable of modifying their activity, **characterised in that** a compound or a mixture containing different compounds, possibly unidentified, is brought into contact with cells expressing on their surface a polypeptide according to claim 1 or 9, under conditions which allow an interaction between the polypeptide and said compound if the latter has an affinity for the polypeptide, and **in that** the compounds bound to the polypeptide or those which are capable of modifying its biological activity are detected and/or isolated.

35. Pharmaceutical composition comprising, as active principle, a polypeptide according to any one of claims 1 to 5 or 9 to 11.

36. Pharmaceutical composition according to the preceding claim, **characterised in that** it comprises a polypeptide according to any one of claims 4, 5 or 10.

37. Use of a polypeptide according to any one of claims 1 to 5, for screening agents capable of modifying the activity of IL-13R $\beta$ .

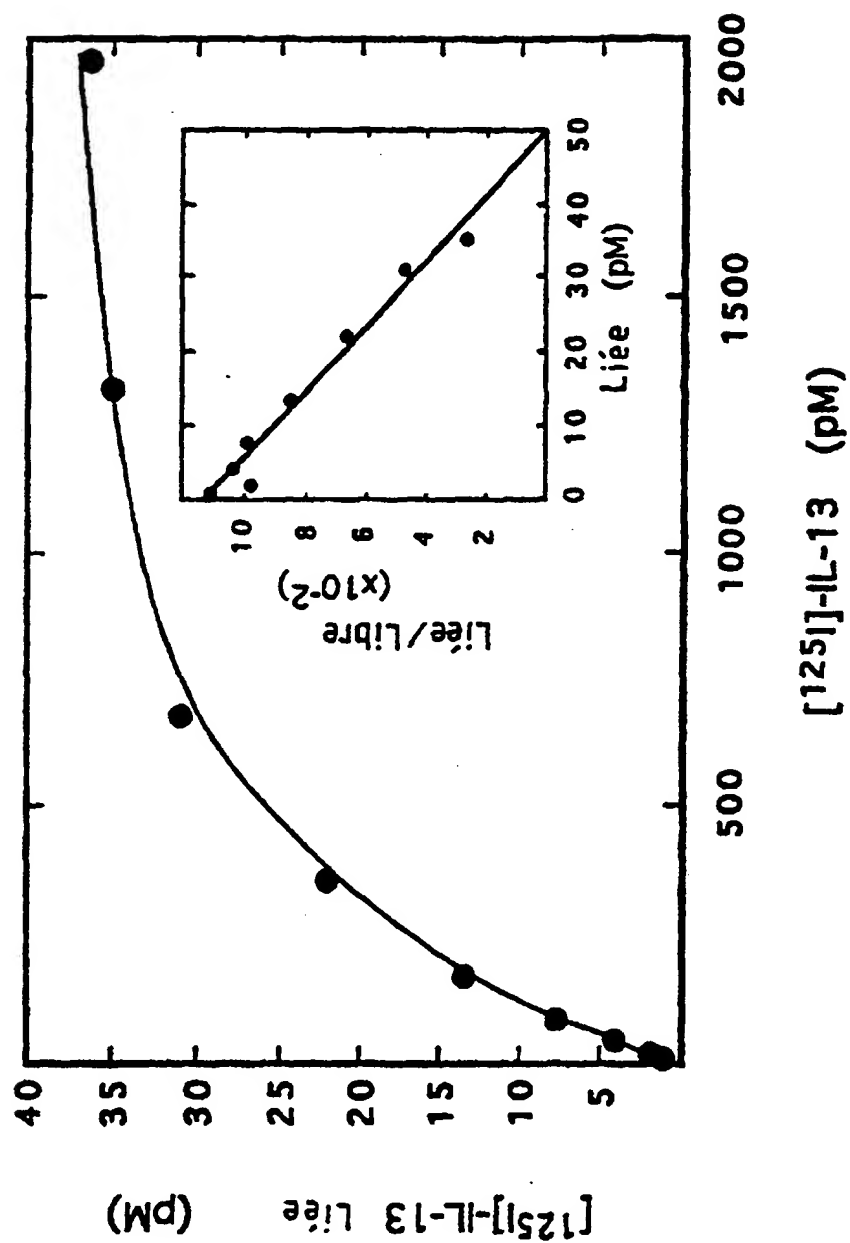
38. Use of a polypeptide according to any one of claims 9 to 11, for screening agents capable of modifying the activity of IL-13R $\alpha$ .

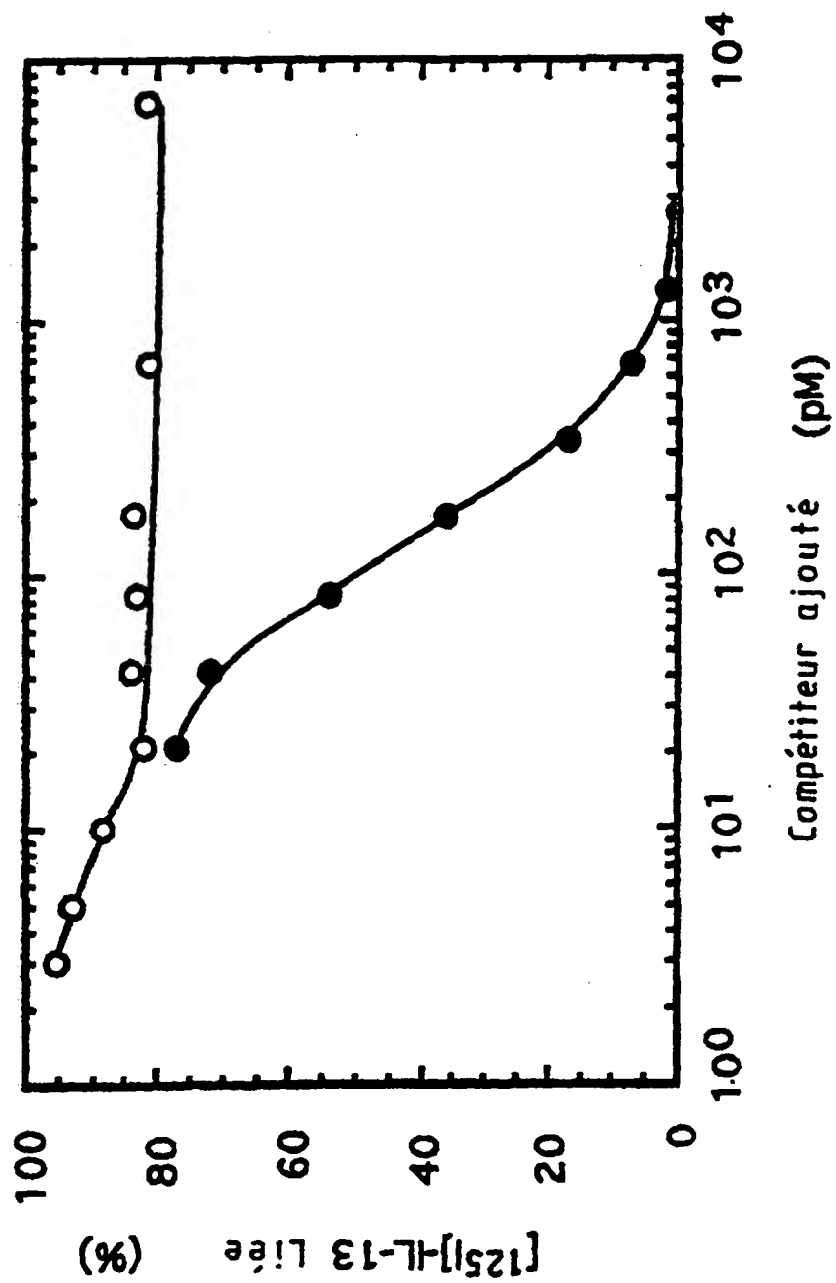
39. Use of a polypeptide according to any one of claims 1 to 5, for preparing products capable of modifying the activity of IL-13R $\beta$ .

40. Use of a polypeptide according to any one of claims 9 to 11, for preparing products capable of modifying the activity of IL-13R $\alpha$ .

41. Use of a polypeptide according to claim 4, 5 or 10 for synthesising an IL-13 antagonistic drug intended for treating conditions which respond to an IL-13 antagonistic effect.

42. Use of a polypeptide according to any one of claims 1 to 5 or 9 to 11 for preparing a pharmaceutical composition which may be used for regularising immunological and inflammatory mechanisms produced by IL-13.

FIG. 1a

FIG.1b

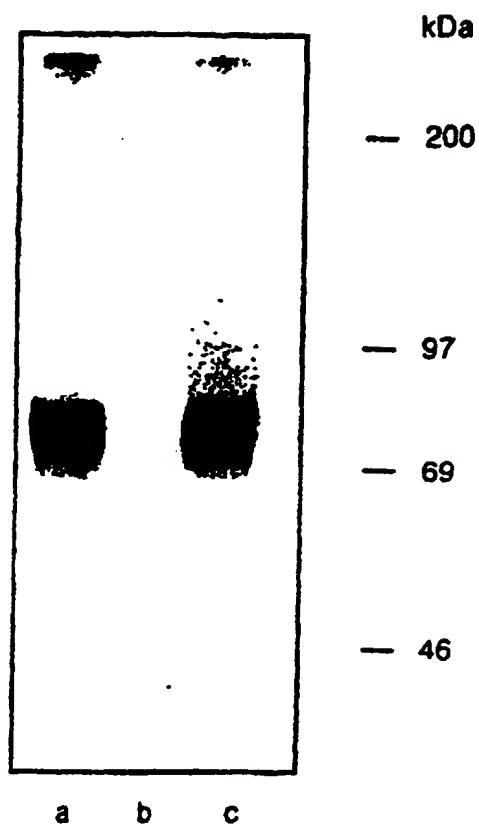


FIG.1c

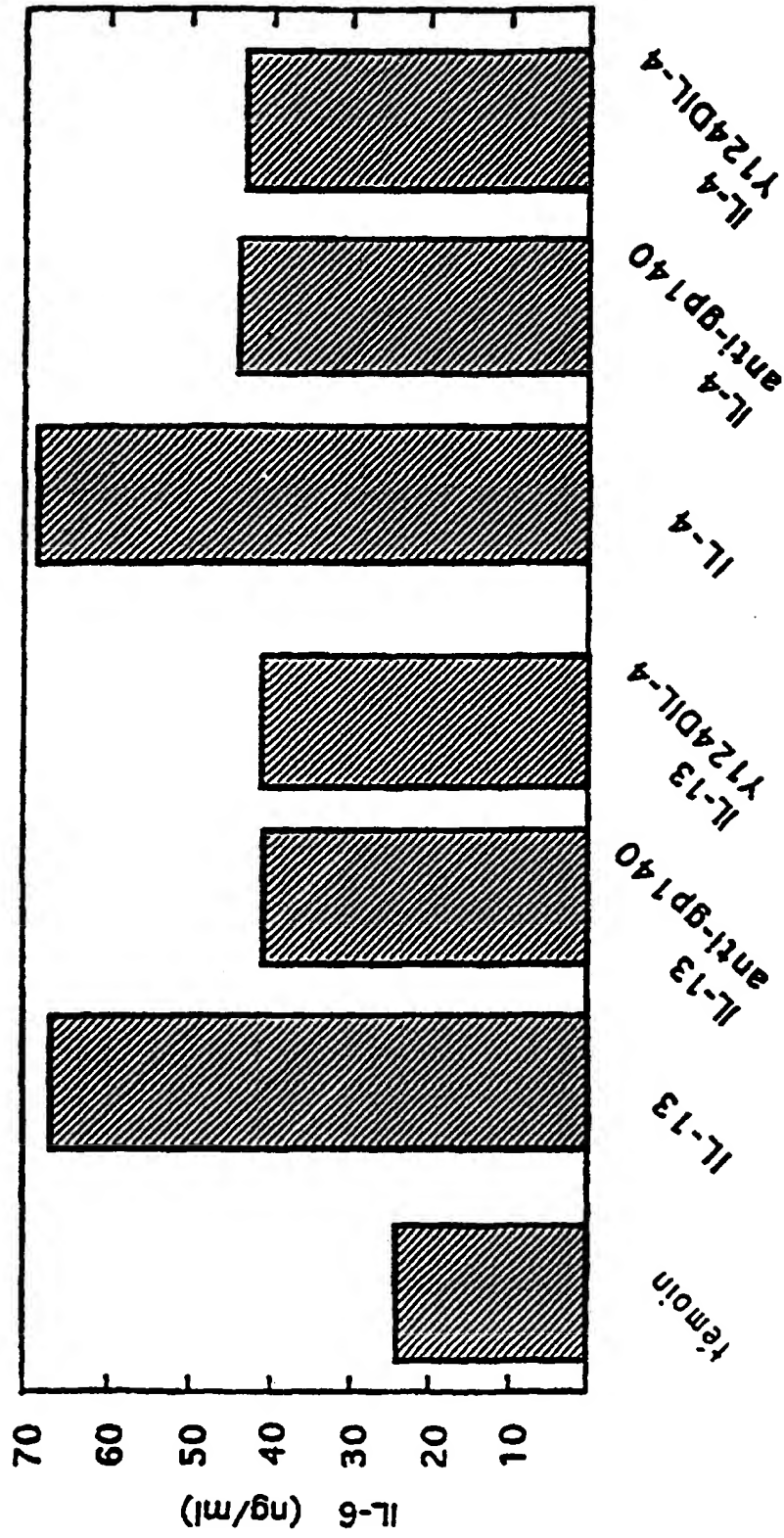


FIG.1d

1	GGTGCCTGTCCGGCGGAGAGAGCAATATCAAGGTTTAAATCTCGAGAAATGGCT	58
1	MetAla	2
59	TTCGTTTGGCTATCGGATCGCTTATATACCTTTCTGATAAGCACAAATTTGGCTGT	118
3	PheValCysLeuAlaIleGlyCysLeuTyrThrPheLeuIleSerThrThzPheGlyCys	22
119	ACTTCATCTTCAGACACCGAGATAAAGTTAAACCTCCTCAGGATTTTGAGATAGTGGAT	178
23	ThrSerSerSerAspThrGluIleLysValAsnProProGlnAspPheGluIleValAsp	42
179	CCCGGATACCTAGGTTATCTCTATTTGGCAATGGCAACCCCACTGCTCTGGATCATTTT	238
43	ProGlyTyrLeuGlyTyrLeuTyrLeuGlnTrpGlnProProLeuSerLeuAspHisPhe	62
239	AAGGAATGCACAGTGGAAATATGAATAAAATACCGAAACATTTGGTAGTGAACATGGAAG	298
63	LysGluCysThrValGluTyrGluLeuLysTyrArgAsnIleGlySerGluThrTrpLys	82
299	ACCATCATTAAGTAATCTACATTACAAAGATGGGTTTGATCTTAAACAGGCGCATTGAA	358
83	ThrIleIleThrLysAsnLeuHisTyrLysAspGlyPheAspLeuAsnLysGlyIleGlu	102
359	GCGAAGATACACACGCTTTTACCATGGCAATGGCAAAATGGATCAGAAATTCAAAGTTCC	418
103	AlaLysIleHisThrLeuLeuProTrpGlnCysThrAsnGlySerGluValGlnSerSer	122
419	TGGGCAGAAACTACTATTGGATATCACCAAGGAATTCAGAACTAAAGTTTCAGGAT	478
123	TrpAlaGluThrThrTyrTrpIleSerProGlnGlyIleProGluThrLysValGlnAsp	142
479	ATGGATTGGGTATATTACAATTGGCAATATTTACTCTGTTCTTGGAAACCTGGCATAGGT	538
143	MetAspCysValTyrTyrAsnTrpGlnTyrLeuLeuCysSerTrpLysProGlyIleGly	162
539	GTACTTCTTGATACCAATTACAACCTGTTTACTGGTATGAGGGCTTGGATCATGCATTA	598
163	ValLeuLeuAspThrAsnTyrAsnLeuPheTyrTrpTyrGluGlyLeuAspHisAlaLeu	182
599	CAGTGTGTGATTACATCAAGGCTGATGGCAAAATATAGGATGCAGATTTCCCTATTG	658
183	GlnCysValAspTyrIleLysAlaAspGlyGlnAsnIleGlyCysArgPheProTyrLeu	202

FIG. 2a

659	GAGGCATCAGACTATAAGATTTCCTATATTTGTGTTAATGGATCATCAGAGAACAGCCT	718
203	GluAlaSerAspTyrLysAspPheTyrIleCysValAsnGlySerSerGluAsnLysPro	222
719	ATCAGATCCAGTTATTTCCACTTTTCAGCTTCAAAATATAGTTAAACCTTTGCCGACGTC	778
223	IleArgSerSerTyrPheThrPheGlnLeuGlnAsnIleValLysProLeuProVal	242
779	TATCTTACTTTTACTCGGAGAGTTCATGTGAAATTAACTGAAATGGAGCATACCTTTTG	838
243	TyrLeuThrPheThrArgGluSerSerCysGluIleLysLeuLysTrpSerIleProLeu	262
839	GGACCTATTCCAGCAAGGTGTTTGTATTATGAAATTGAGATCAGAGAAGATGATACTACC	898
263	GlyProIleProAlaArgCysPheAspTyrGluIleGluIleArgGluAspThrThr	282
899	TTGGTGACTGCTACAGTTGAAATGAAACATACACCTTGAAACAAACAAATGAAACCCGA	958
283	LeuValThrAlaThrValGluAsnGluThrTyrThrLeuLysThrThrAsnGluThrArg	302
959	CAATTATGCTTTGTAGTAAGAACCAAGTGAATATTTATTTGCTCAGATGACGGAATTGG	1018
303	GlnLeuCysPheValValArgSerLysValAsnIleTyrCysSerAspAspGlyIleTrp	322
1019	AGTGAGTGGAGTGATAAACAAATGCTGGGAAGGTGAAGACCTATCGAAGAAACCTTTGCTA	1078
323	SerGluTrpSerAspLysGlnCysTrpGluGlyGluAspLeuSerLysLysThrLeuLeu	342
1079	CGTTTCTGGCTACCATTTGTTTCATCTTAATATATTAGTTATATTTGTAAACGGTCTGCTT	1138
343	ArgPheTrpLeuProPheGlyPheIleLeuIleLeuValIlePheValThrGlyLeuLeu	362
1139	TTGCGTAAGCCAAACACCTACCCAAATAATGATTCCAGAAATTTTCTGTGATACATGAAGA	1198
363	LeuArgLysProAsnThrTyrProLysMetIleProGluPhePheCysAspThr	381
1199	CTTTCATATCAAGAGACATGGTATTGACTCAACAGTTTCCAGTCATGCGCCAAATGTTCA	1258
1259	ATATGAGTCTCAATAAAGTGAATTTTCTTCCGAATGTTG	1298

FIG.2a (suite)



IL13R MAFVCLAIGCLYTFLLISTTFGCTSSSDTEIKVNPPQDFEIVDPGYLGYLEY 50  
 IL5R ..MIIVAHVLLLELLGATELLQADLLPDEKISLLPPVNFTIKVTG.LAQVL 47

IL13R LQWQPPLSLDHFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLHYKDGFDLNKG 100  
 IL5R LQWKPNPDQEQ.RNVNLEYQVKINAPKEDDYETRITES...KCVTILHKG 93

IL13R IEAKIHTLLPWQCTNGSEVQSSWAETTYWISPOGIPETKVQDMDQV.... 146  
 IL5R FSASVRTILQ...NDHSLASSWASAE.LHAPPGSPGTSIVNLTTITNTT 139

IL13R ..YYNWQ.....YLLSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDHALQVDYIK 189  
 IL5R EDNYSRLRSYQVSLHQTWLVGTDAPEDTQYFLYRYGSWTE..EQEYSK 187

IL13R AD.GONIGCRFP..YLEASDYKDFYICVNGSSSENKPIRSSYFTFOLQNTIV 236  
 IL5R DTLGRNIAQWFPRTFILSKGRDWLSVLVNGSSSKHSAIRPFDQLFALHAID 237

IL13R KPLPPVYLTFTRSSCEIKLKWSIPLGP.PARCFDYEIEIREDDTTLVTA 286  
 IL5R QINPPLNVTAETEST.RLSIQWEKPVSAFPIHCFDYEVKIHNTNRNGYLQI 286

IL13R TVENETYTLKTTNETRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIIWSEWSKQKCWEGEDL 336  
 IL5R EKLMTNAFISIIIDLSKYDVQVRAAVSSMCREAGIIWSEWSQ.PIYVGND 335

IL13R SKKTLLRFLWLPFGFILILVIFVTGLLLRKPNTPKMP.....EF 376  
 IL5R HKPLREWFVIVIMATICFILLILSLICKICHLWIKLFPPIPAPKSNIKDL 385

IL13R FCDT..... 380  
 IL5R FVTINYEKAGSSETEIEVICYIEKPGVETLEDVSF 420

FIG. 2b

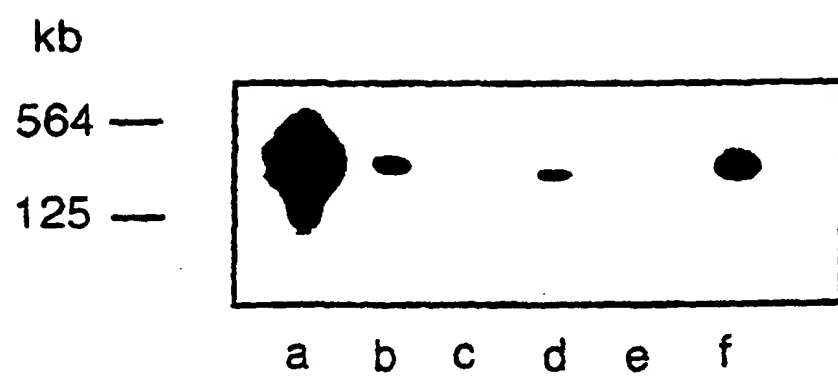


FIG.3

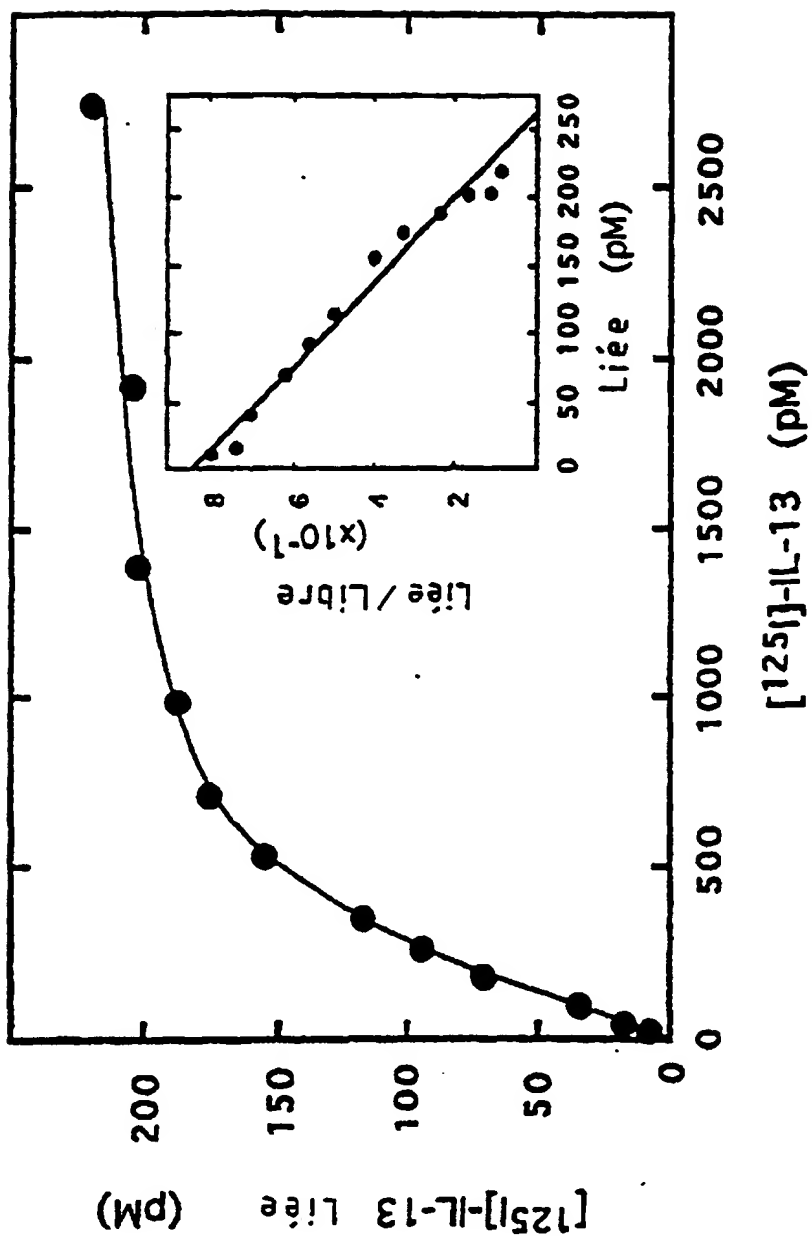


FIG. 4a

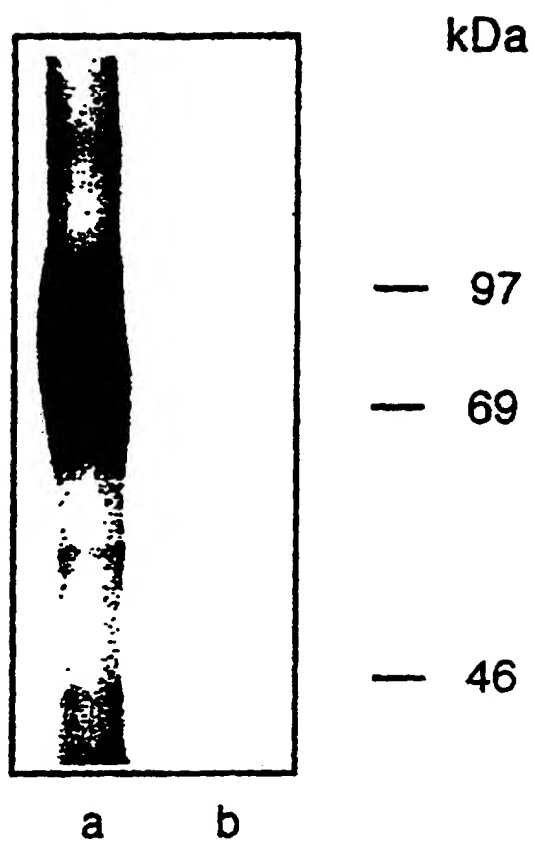
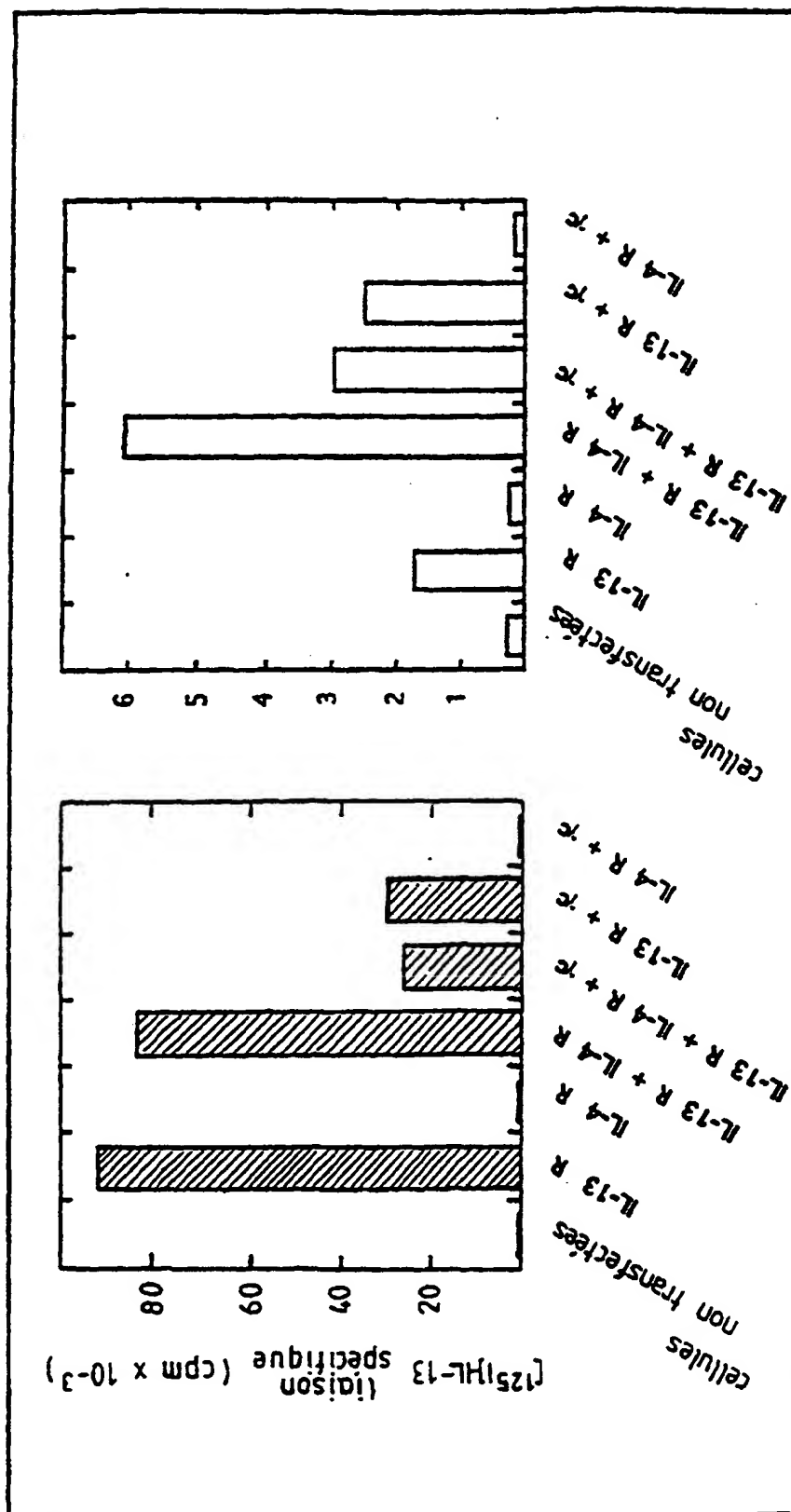


FIG. 4b



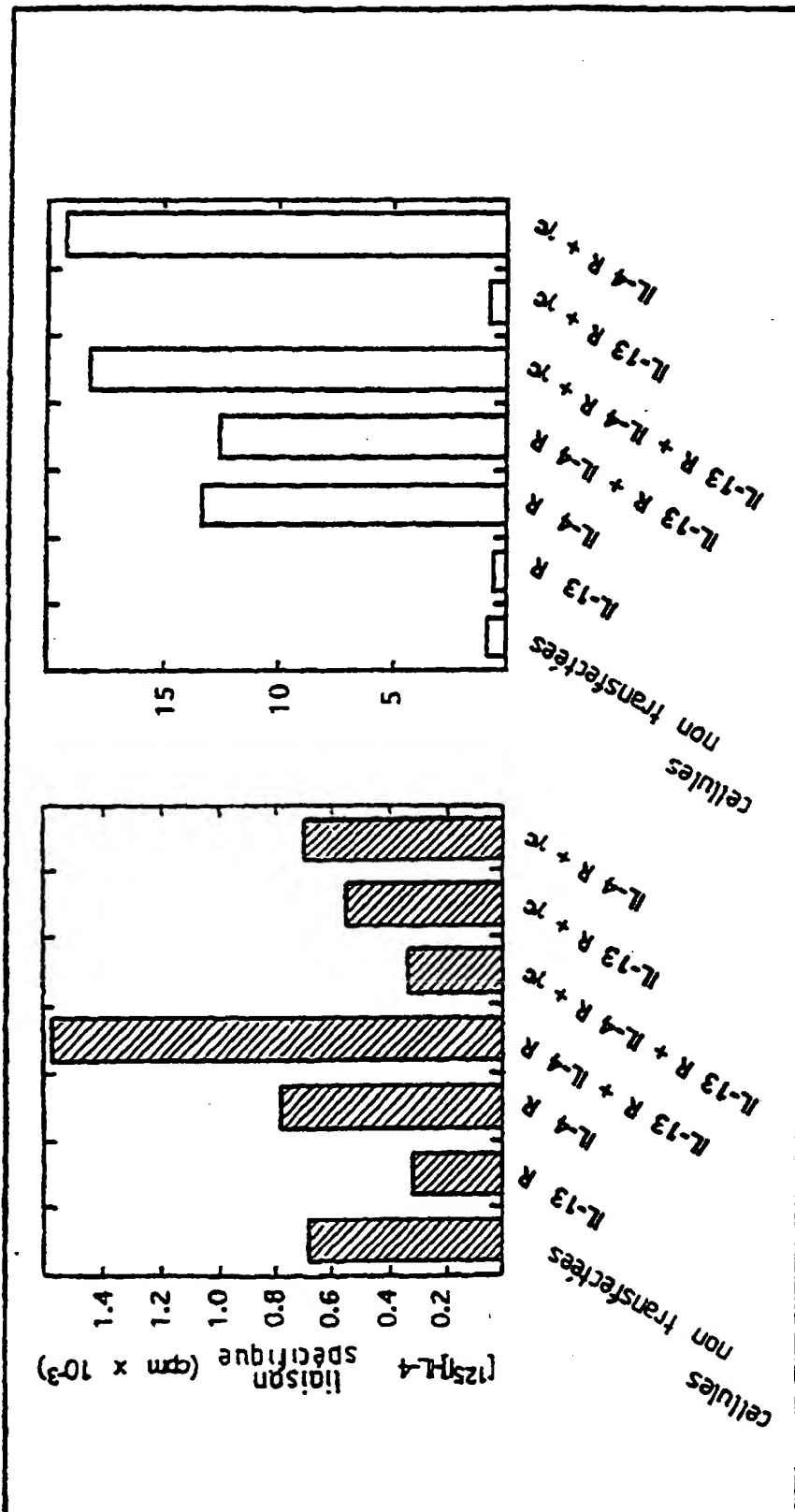


FIG.4d

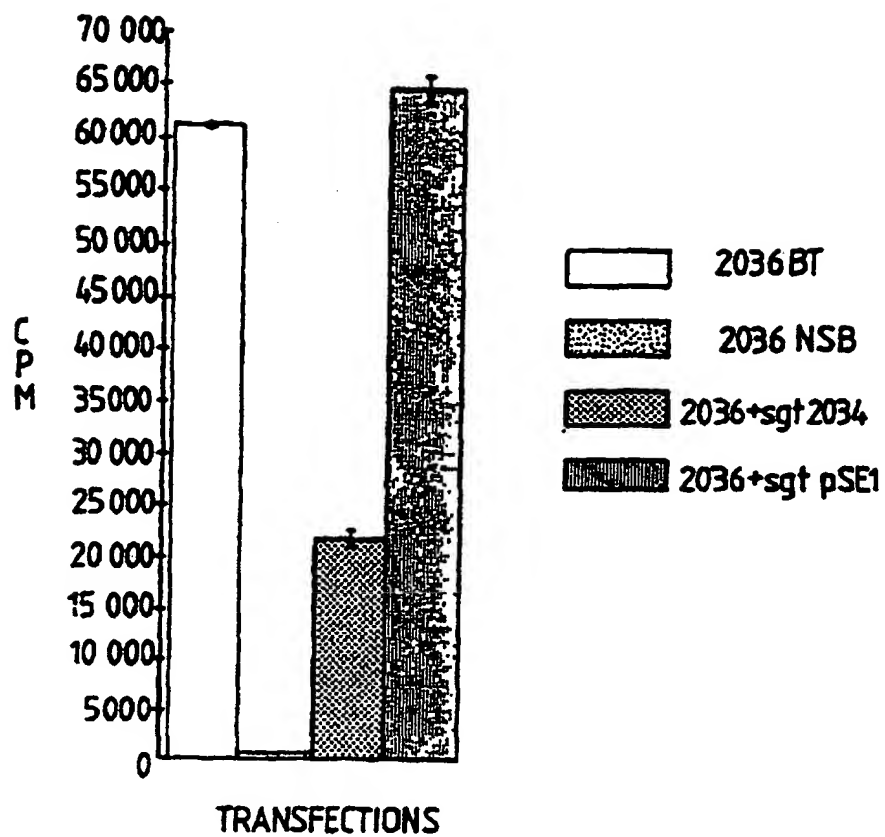


FIG. 5

FIG. 6

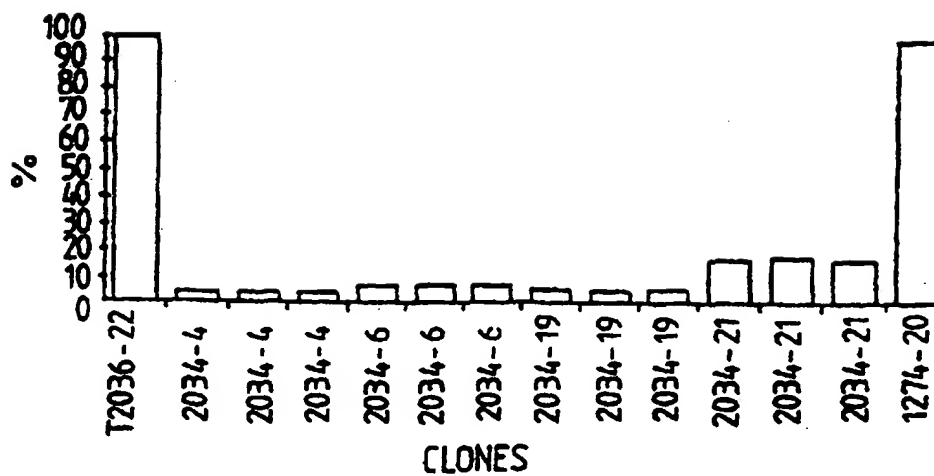


FIG. 7a



1381	TATCTGGGAACCTTATTAATGGAACTGAACTACTGCACCATTAAAAACAGGCAGCTC	1440
1441	ATAAGAGCCACAGGTCTTTATGTTGAGTCGCGCACCGAAAACTAAAAATAATGGGCGCT	1500
1501	TTGGAGAAGAGTGTGGAGTCATTCTCATTGAATTATAAAAGCCAGCAGGCTTCAAAC TAG	1560
1561	GGGACAAAGCAAAAAGTGATGATAGTGGTGGAGTTAATCTTATCAAGAGTTGTGACAACT	1620
1621	TCCTGAGGGATCTATACTTGCTTTGTGTTCTTTGTGTCAACATGAACAAATTTTATTTGT	1680
1681	AGGGGAACCTCATTTGGGGTGCAAATGCTAATGTCAAACCTTGAGTCACAAAGAACATGTAG	1740
1741	AAAACAAAATGGATAAAATCTGATATGTATTGTTTGGGATCCTATTGAACCATGTTTGTG	1800
1801	GCTATTAAAACTCTTTTAACAGTCTGGGCTGGGTCCGGTGGCTCACGCCCTGTAATCCAG	1860
1861	CAATTTGGGAGTCCGAGCGGGCGGATCAGTCGAGGTGAGGAGTTCCAGACCAGCCTGAC	1920
1921	CAAAATGGTGAAACCTCCTCTCTACTAAAACTACAAAAATTAAC TGGGTGTGGTGGCGCG	1980
1981	TGCCTGTAATCCAGCTACTCGGGAAGCTGAGGCAGGTGAATTGTTTGAACCTGGGAGGT	2040
2041	GGAGGTTGCAGTGAGCAGAGATCACACCAGTCACTCTAGCCTGGGTGACAGAGCAAGAC	2100
2101	TCTGTCTAAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACCTCTTAATATTCTGGAGT	2160
2161	CATCATTCCTTTCGACAGCATTTTCTCTGCTTTGAAAGCCCCAGAAATCAGTGTGGCC	2220
2221	ATGATGACAACTACAGAAAAACCAGAGGCAGCTTCTTTGCCAAGACCTTTCAAAGCCATT	2280
2281	TTAGGCTGTTAGGGGCGAGTGAGGTAAATGACTCCTTGGGTATTAGAGTTTCAACCATG	2340
2341	AAGTCTCTAACAAATGTATTTTCTTCAACCTCTGCTACTCAAGTAGCATTTACTGTGTCTTT	2400
2401	GGTTTGTGCTAGGCCCCCGGGTGTGAAGCACAGACCCCTTCCAGGGGTTTACAGTCTATC	2460
2461	TGAGACTCCTCAGTTCTTGCCACTTTTTTTTTTAATCTCCACCAGTCATTTTTCAGACCT	2520
2521	TTTAACTCCTCAATTCCAACACTGATTTCCCTTTTGCATTCTCCCTCCTTCCCTTCCTT	2580
2581	GTAGCCTTTTGACTTTTCAATTGGAATTAGGATGTAATCTGCTCAGGAGACCTGGAGGAG	2640
2641	CAGAGGATAATTAGCATCTCAGGTTAAGTGTGAGTAATCTGAGAAACAAATGACTAATTCT	2700
2701	TGCATATTTTGTAACCTTCCATGTGAGGGTTTTTCAGCATTGATATTGTGTCATTTCTAAA	2760
2761	CAGAGATGAGGTGGTATCTTCACGTAGAACATTGGTATTCGCTTGAGAAAAAAGAATAG	2820
2821	TTGAACCTATTTCTCTTTCTTTACAAGATGGGTCCAGGATTCCTCTTTTCTCTGCCATAA	2880
2881	ATGATTAATTAATAGCTTTTGTGTCTTACATTGGTAGCCAGCCAGCCAAGGCTCTGTTT	2940
2941	ATGCTTTTGGGGGGCATATATTGGGTTCCATTCTACCTATCCACACAACATATCGTAT	3000
3001	ATATCCCCCTCTACTCTTACTTCCCCCAAATTTAAAGAAATGAGGAAATGAGAGGCATTT	3060
3061	CCCCCACCCTATTTCTCTCCTCACACACAGACTCATATTACTGGTAGGAACTTGAGAACT	3120
3121	TTATTTCCAAGTTGTTCAAACATTTACCAATCATATTAATACAATGATGCTATTTGCAAT	3180
3181	TCCTGCTCCTAGGGGAGGGGAGATAAGAAACCCCTACTCTCTACAGGTTTGGGTACAAGT	3240
3241	GGCAACCTGCTTCCATGGCCGTGTAGAAGCATGGTGCCCTGGCTTCTCTGAGGAAGCTGG	3300
3301	GGTTCATGACAATGGCAGATGTAAAGTTATCTTGAAGTCAGATTGAGGCTGGGAGACAG	3360
3361	CCGTAGTAGATGTTCTACTTTGTCTGCTGTTCTCTAGAAAGAATATTGGTTTCTCTGT	3420
3421	ATAGGAATGAGATTAATTCCTTTCCAGGTATTTTATAATTCTGGGAAGCAAAACCCATGC	3480
3481	CTCCCCCTAGCCATTTTTACTGTTATCTTATTTAGATGGCCATGAAGAGGATGCTGTGAA	3540
3541	ATTCCCAACAAACATTGATGCTGACAGTCAATGAGTCTGGGAGTGGGGAAGTGATCTTTT	3600
3601	GTTCCCATCCTCTTCTTTTAGCAGTAAATAGCTGAGGGAAGGGAGGGAAGGAAGT	3660
3661	TATGGGAATACCTGTGGTGGTGTGATCCCTAGGTCTTGGGAGCTCTTGAGGTTGTCTGT	3720
3721	ATCAGTGGATTTCCCATCCCCCTGTGGGAATTAGTAGGCTCATTTACTGTTTATAGGTCTA	3780
3781	GCCTATGTGGATTTTTTCTTAACATACCTAAGCAAAACCCAGTGTGAGGATGGTAATTCTT	3840
3841	ATTCTTTCTGTTCAAGTTAAGTTTTTCCCTTCATCTGGGCACTGAAGGGATATGTGAAACAA	3900
3901	TGTTAACATTTTTGGTAGTCTTCAACCAGGATGTTTCTGTTTAACTTCTTATAGGAAA	3960
3961	GCTTGAGTAAAAATAAATATTGTCTTTTTGTATGTACCCAAAAAaaaaa 4009	

FIG. 7a(suite)

FIG. 7b

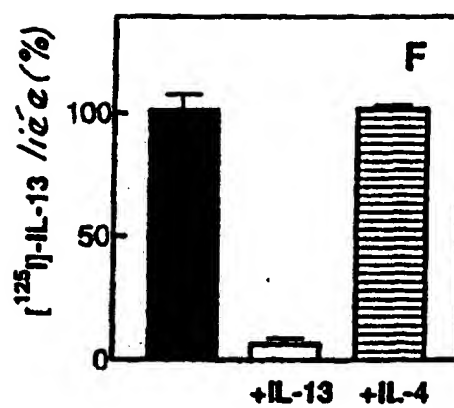
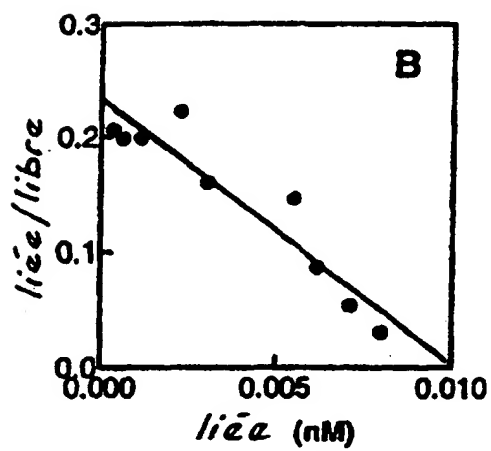
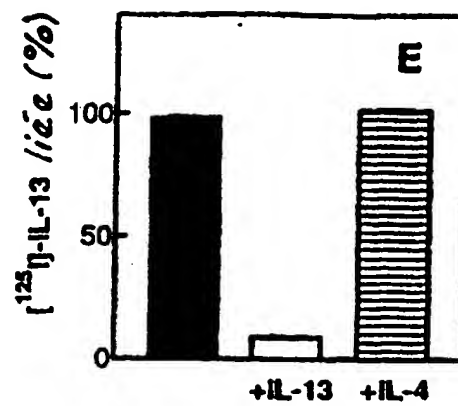
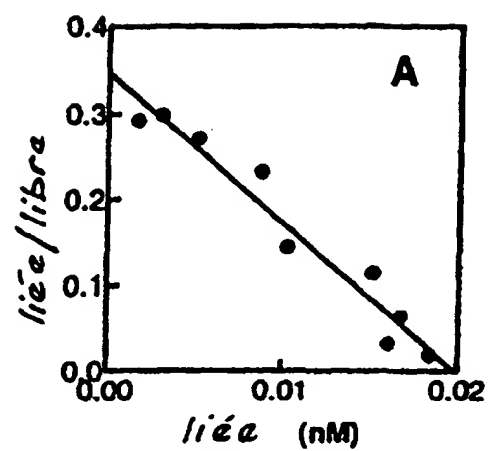


FIG.8

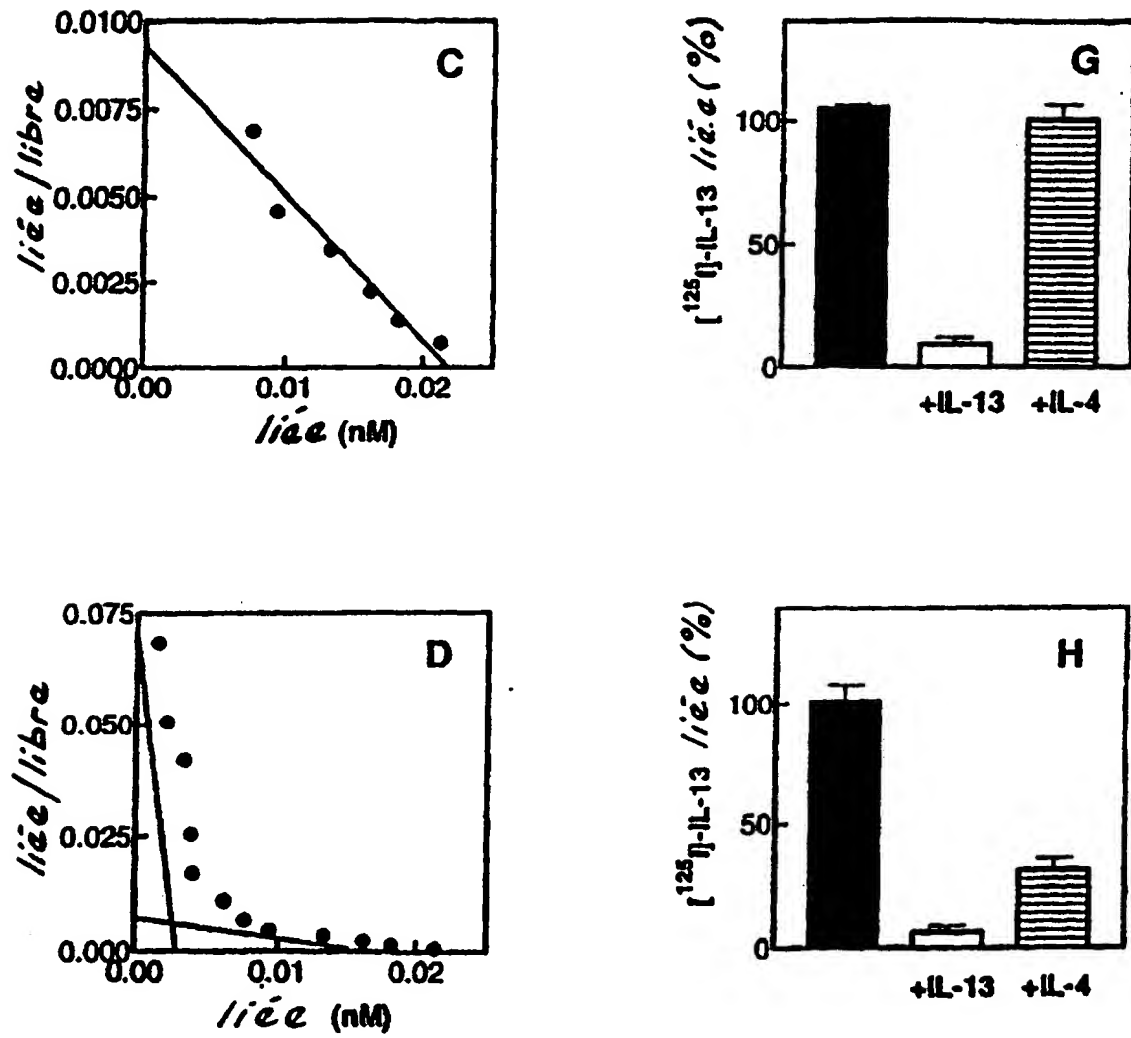


FIG.8 (suite)

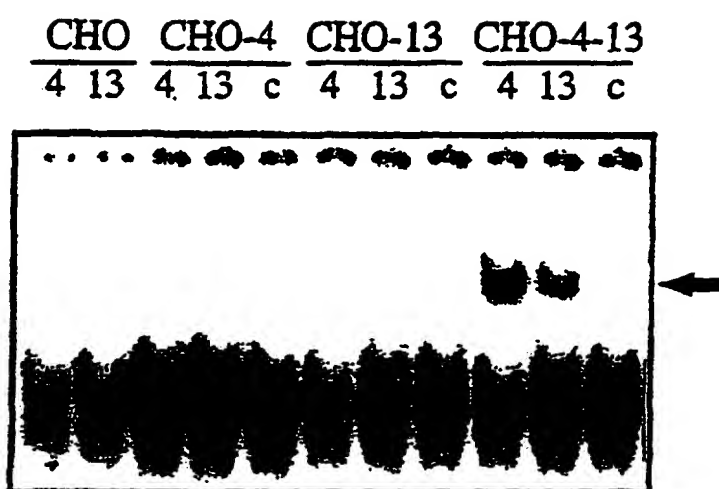


FIG.9